

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

VIERING, JENTSCHURA & PARTNER
Steinsdorfstr. 6
D-80538 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 28 juin 2001 (28.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P 18920	
International application No. PCT/DE00/01873	International filing date (day/month/year) 08 juin 2000 (08.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address PIERIS PROTEOLAB AG Blumentstrasse 16 85354 Freising Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: New applicant for all designated States except US. SKERRA, Arne and SCHLEHUBER, Steffen stay applicant/inventors for US only.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35		Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 20 March 2001 (20.03.01)	
International application No. PCT/DE00/01873	Applicant's or agent's file reference P 18920
International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)
Applicant SCHLEHUBER, Steffen	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

04 January 2001 (04.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Henrik Nyberg
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 March 1999 (1999-03-02), pages 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8 April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/UE 00/01873

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 318, 1996, pages 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2;</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 219, no. 3, 1994, pages 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 cited in the application figure 1</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27 July 1989 (1989-07-27) example 21</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15 April 1998 (1998-04-15) the whole document</p>	
P,X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 297, no. 5, 14 April 2000 (2000-04-14), pages 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 the whole document</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01873

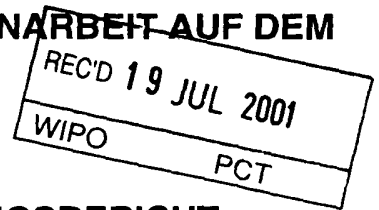
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9916873 A	08-04-1999	DE 19742706 A AU 1143799 A EP 1017814 A	15-04-1999 23-04-1999 12-07-2000
WO 8906698 A	27-07-1989	DE 3813278 A AT 87665 T DE 58903898 D EP 0324474 A ES 2054883 T HK 116996 A JP 7031194 B JP 1503647 T US 5702888 A US 5344757 A	20-07-1989 15-04-1993 06-05-1993 19-07-1989 16-08-1994 12-07-1996 10-04-1995 07-12-1989 30-12-1997 06-09-1994
EP 0835934 A	15-04-1998	DE 19641876 A	16-04-1998

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 18920	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01873	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder SKERRA, Arne et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 17.07.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Seranski, P Tel. Nr. +49 89 2399 7846 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteil** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-43 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-17 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1-4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-21, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	4-5, 9-14, 16-17
	Nein: Ansprüche	1-3, 6-8, 15
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	4, 9-14, 16-17
	Nein: Ansprüche	5
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

1. Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Art.35(2) PCT hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1.1 Neuheit Art. 33(2) PCT

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08)

Beansprucht werden Muteine des Bilin Bindeproteins, die die Eigenschaften aufweisen, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden.

Im Dokument D1 werden sechs Aminosäurebereiche beschrieben, die für den Zweck der vorliegenden Anmeldung geeignet sind (Seite 40, Tabelle 1), da sie die gleichen Aminosäureaustausche aufweisen und demnach auch Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins binden können.

Die bereits beschriebenen Varianten weisen ebenfalls Mutationen an den Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 auf, übereinstimmend mit den Positionen des Anspruch 1 (c).

Somit können die Gegenstände der Ansprüche 1-3, 8, 15 nicht als neu gemäss Artikel 33(2) PCT angesehen werden, da die in den besagten Ansprüchen offenbarten Proteine und Nukleinsäuren sowie das Verfahren zur Herstellung besagter Proteine und Nukleinsäuren bereits im Dokument D1 offenbart wurden.

Das Dokument D1 offenbart bereits Muteine des in der vorliegenden Anmeldung als Grundlage für die Digoxigenin-Bindung eingesetzten, mutierten Bilin Bindeproteins, in D1 bezeichnet als Anticalin. Spezifische Muteine, die auch in der vorliegenden Anmeldung beansprucht werden, werden bereits in D1 vorgeschlagen (Seite 40, Tabelle 1) bzw. spezifische Aminosäuresubstitutionen des Unteranspruchs 3 stimmen mit den in D1 offenbarten Substitutionen überein: Ser (35)->His, Asn (58)->Arg, His (60)->Ser, Ile (69)->Ser, Asn (97)->Gly und Phe (127)->Leu. Diese in D1 offenbarten Muteine mit den entsprechenden Substitutionen haben dementsprechend die gleichen technischen Merkmale wie in Anspruch 1 offenbart. Die Aminosäuresequenz der in D1 offenbarten Muteine und der in der vorliegenden Anmeldung beanspruchten

Polypeptide sind somit strukturell identisch. Die durch Teilanspruch 1(a) als charakterisierendes Merkmal zugefügte Funktionsweise des Polypeptids muss somit implizit auch inhärentes Merkmal der in D1 offenbarten Muteine sein. Die zusätzliche Charakterisierung des Polypeptids aus Anspruch 1 aufgrund der Funktion ändert nichts an der Tatsache, dass das Polypeptid eine identische Struktur hat wie das Polypeptid aus D1. Lediglich die Zuordnung einer weiteren, bisher unbekannten Funktion reicht nicht aus, um einen bekannten Stoff als neu zu bezeichnen.

1.2 Anspruch 2 ist nicht als neu gemäss Art. 33(2) anzusehen, da das charakterisierende technische Merkmal der Dissoziationskonstante den bereits in D1 offenbarten Muteinen implizit ist.

1.3 Der Gegenstand der Ansprüche 6 und 7 ist nicht neu, da bereits in D1 (S.14 Zeile 28-29) Fusionsproteine des Lipocalin-Strukturgens offenbart wurden.

1.4 Der Schutzbereich des Anspruchs 8 umfasst ebenfalls Nukleinsäuren, die bereits in D1 offenbart wurden, daher erfüllt Anspruch 8 nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT.

1.5 Das Verfahren in Anspruch 15 ist nicht neu gemäss Artikel 33(2) PCT, da das gleiche Verfahren für die bereits beschriebenen Proteine in D1 offenbart wurde (s.D1, Seite 38-41).

1.6 Anspruch 5 erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikel 33(3) PCT, da das Koppeln von Markierungsgruppen an ein bekanntes Polypeptid ein dem Fachmann geläufiges, gängiges Verfahren ist und daher nicht als erfinderisch angesehen werden kann.

1.7 Die spezifische Offenbarung des Anspruchs 4, in der ein Polypeptid mit der Seq-ID N° 15 beansprucht wird und des Anspruchs 9 in der die spezifische Nukleinsäure mit der Seq-ID N° 15 beansprucht wird ist neu über die Offenbarung in Dokument D1 (Art. 33(2) PCT). Dieses Polypeptid besitzt die Eigenschaft, selektiv Digoxigeningruppen zu binden, eine Eigenschaft, die zuvor aus dem Stand der Technik nicht bekannt war, daher liegt der Offenbarung des spezifischen Polypeptids eine erfinderische Tätigkeit gemäss Art. 33(3) PCT zugrunde.

1.8 Ansprüche 10-14 offenbaren ein Verfahren zur Herstellung von Muteinen des Bilin-Bindeproteins, die spezifisch an Digoxigeningruppen binden. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass spezifische Sequenzpositionen des Bilin-Bindeproteins gezielt einer Mutagenese unterzogen werden.

Das Dokument D1 repräsentiert den nächsten Stand der Technik, da es bereits Muteine des Bilin-Bindeproteins offenbart.

Weder die Eigenschaft, dass Muteine des Bilin-Bindeproteins spezifisch an Digoxigeningruppen binden können noch die spezifischen Sequenzpositionen, die sich für eine derartige Mutagenese eignen, sind in D1 beschrieben. Das zweistufige Verfahren der Mutagenese aus Anspruch 10 ist ebenfalls nicht aus dem Stand der Technik bekannt. Daraus ergibt sich das objektive technische Problem, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Muteine des Bilin-Bindeproteins erzeugt werden können, die spezifisch an Digoxigenin binden. Dieses Verfahren ist weder aus dem Stand der Technik bekannt noch würde der Fachmann mit dem Wissen aus dem Dokument D1 darauf schliessen können, dass sich Muteine des Bilin-Bindeproteins herstellen lassen, die spezifisch an Digoxigenin binden. Somit erfüllen die Ansprüche 10-14 die Voraussetzungen des Artikels 33 PCT.

1.9 Die gleiche Argumentation wie unter 1.8 lässt sich für den Verwendungsanspruch 16 und den Verfahrensanspruch 17 anwenden, die sich jeweils auf die spezifische Bindeaktivität des mutierten Bilin-Bindeproteins in Bezug auf Digoxigeningruppen beziehen. Die Ansprüche erfüllen die Voraussetzungen des Artikels 33 PCT.

2. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass aufgrund des Neuheitseinwandes im Prinzip jede einzelne Mutation des Bilin Bindeproteins eine eigene Erfindung darstellt. Der Gegenstand der Ansprüche erfüllt daher nicht die Erfordernisse von Regel 13.1 PCT - Einheitlichkeit der Erfindung. Dieser Einwand wird gegebenenfalls während der regionalen Phase der Anmeldung weiterverfolgt.

09/980502/136 W
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

ST

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 18920	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01873	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 08 June 1999 (08.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant SKERRA, Arne		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 04 January 2001 (04.01.01)	Date of completion of this report 17 July 2001 (17.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01873

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-43 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-17 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1-4 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____ 1-21 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	4-5, 9-14, 16-17	YES
	Claims	1-3, 6-8, 15	NO
Inventive step (IS)	Claims	4, 9-14, 16-17	YES
	Claims	5	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1.1 Novelty - PCT Article 33(2)**

Reference is made to the following document:

D1: WO-A-99/16873 (SCHMIDT FRANK; SKERRA ARNE (DE);
BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8 April 1999
(1999-04-08)

The application claims muteins of the bilin binding protein which have the properties of binding digoxigenin or conjugates thereof. D1 describes six amino acid ranges suitable for the purpose of the present application (page 40, Table 1) since they display the same amino acid exchanges and consequently can also bind digoxigenin or conjugates thereof.

The variants already described likewise have mutations in sequence positions 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 and 127, corresponding to the positions in Claim 1(c).

Therefore the subjects of Claims 1-3, 8 and 15 cannot be considered novel under PCT Article 33(2) since the proteins and nucleic acids disclosed in these claims and

the method of producing said proteins and nucleic acids were already disclosed in D1.

D1 already discloses muteins of the mutated bilin binding protein, designated anticalin in D1 and used in the present application as a basis for digoxigenin binding. Specific muteins which are also claimed in the present application are already proposed in D1 (page 40, Table 1) and specific amino acid substitutions in subclaim 3 correspond to the substitutions disclosed in D1: Ser (35)->His, Asn (58)->Arg, His (60)-> Ser, Ile (69)->Ser, Asn (97)->Gly and Phe (127)-> Leu. These muteins disclosed in D1 with the corresponding substitutions accordingly display the same technical features as those disclosed in Claim 1. The amino acid sequence of the muteins disclosed in D1 and of the polypeptides claimed in the present application are thus structurally identical. The method of functioning of the polypeptide which is added as a characterizing feature by part Claim 1(a) must therefore implicitly also be an inherent feature of the muteins disclosed in D1. The additional characterization of the polypeptide from Claim 1 on the basis of its function does not alter the fact that the polypeptide has exactly the same structure as the polypeptide in D1. The mere association of a further, hitherto unknown, function is not sufficient to designate a known substance as novel.

1.2 Claim 2 cannot be considered novel under PCT Article 33(2) since the characterizing technical feature of the dissociation constant is already implicit in the muteins disclosed in D1.

1.3 The subject matter of Claims 6 and 7 is not novel since D1 (page 14, lines 28-29) already discloses the lipocalin structural gene fusion proteins.

1.4 The scope of protection of Claim 8 likewise covers nucleic acids which were already disclosed in D1; therefore Claim 8 does not meet the requirements of PCT Article 33(2).

1.5 The method in Claim 15 is not novel under PCT Article 33(2) since the same method was disclosed for the proteins already described in D1 (see D1, pages 38-41).

1.6 Claim 5 does not meet the requirements of PCT Article 33(3) since the coupling of marking groups to a known polypeptide is routine practice for a person skilled in the art and therefore cannot be considered inventive.

1.7 The specific disclosure in Claim 4 in which a polypeptide having SEQ ID NO 15 is claimed and that of Claim 9 in which the specific nucleic acid with SEQ ID NO 15 is claimed is novel over the disclosure in D1 (PCT Article 33(2)). This polypeptide has the property of binding digoxigenin groups selectively, a property not previously known from the prior art; therefore the disclosure of the specific polypeptide involves an inventive step pursuant to PCT Article 33(3).

1.8 Claims 10 to 14 disclose a method of producing muteins of the bilin binding protein which bind specifically to digoxigenin groups. This method is characterized in that the specific sequence positions of the bilin binding protein are specifically subjected to mutagenesis.

D1 represents the closest prior art since it already discloses muteins of the bilin binding protein.

Neither the property whereby muteins of the bilin binding protein can bind specifically to digoxigenin groups nor the specific sequence positions which are suitable for such mutagenesis are described in D1. The two-stage mutagenesis method in Claim 10 is likewise not known from the prior art, resulting in the objective technical problem of devising a method by means of which muteins of the bilin binding protein which bind specifically to digoxigenins can be produced. This method is neither known from the prior art, nor would a person skilled in the art, familiar with D1, have been able to conclude that muteins of the bilin binding protein which bind specifically to digoxigenin can be produced. Therefore Claims 10 to 14 meet the requirements of PCT Article 33.

1.9 The same arguments as in point 1.8 apply to use Claim 16 and method Claim 17, which each concern the specific binding activity of the mutated bilin binding protein in relation to digoxigenin groups. The claims meet the requirements of PCT Article 33.

2. Lack of unity of invention

The applicant should note that, owing to the objection for lack of novelty, in principle each individual mutation of the bilin binding protein represents a separate invention. Therefore the subject matter of the claims does not meet the requirements of PCT Rule 13.1 - Unity of invention. This objection may be prosecuted further during the regional phase of the application.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 18920	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01873	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/1999
Anmelder SKERRA, Arne		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 5, 2. März 1999 (1999-03-02), Seiten 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph ---	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims --- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 318, 1996, Seiten 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2; ----</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 219, Nr. 3, 1994, Seiten 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ----</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27. Juli 1989 (1989-07-27) Beispiel 21 ----</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15. April 1998 (1998-04-15) das ganze Dokument ----</p>	
P, X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 297, Nr. 5, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument -----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01873

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9916873	A	08-04-1999	DE	19742706 A	15-04-1999
			AU	1143799 A	23-04-1999
			EP	1017814 A	12-07-2000
<hr/>					
WO 8906698	A	27-07-1989	DE	3813278 A	20-07-1989
			AT	87665 T	15-04-1993
			DE	58903898 D	06-05-1993
			EP	0324474 A	19-07-1989
			ES	2054883 T	16-08-1994
			HK	116996 A	12-07-1996
			JP	7031194 B	10-04-1995
			JP	1503647 T	07-12-1989
			US	5702888 A	30-12-1997
			US	5344757 A	06-09-1994
<hr/>					
EP 0835934	A	15-04-1998	DE	19641876 A	16-04-1998
<hr/>					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 March 1999 (1999-03-02), pages 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8 April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims	
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat al Application No

PCT/DE 00/01873

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family. structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 318, 1996, pages 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2; ---</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 219, no. 3, 1994, pages 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 cited in the application figure 1 ---</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27 July 1989 (1989-07-27) example 21 ---</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15 April 1998 (1998-04-15) the whole document ---</p>	
P, X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 297, no. 5, 14 April 2000 (2000-04-14), pages 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 the whole document -----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01873

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9916873	A	08-04-1999	DE 19742706 A	15-04-1999
			AU 1143799 A	23-04-1999
			EP 1017814 A	12-07-2000
WO 8906698	A	27-07-1989	DE 3813278 A	20-07-1989
			AT 87665 T	15-04-1993
			DE 58903898 D	06-05-1993
			EP 0324474 A	19-07-1989
			ES 2054883 T	16-08-1994
			HK 116996 A	12-07-1996
			JP 7031194 B	10-04-1995
			JP 1503647 T	07-12-1989
			US 5702888 A	30-12-1997
			US 5344757 A	06-09-1994
EP 0835934	A	15-04-1998	DE 19641876 A	16-04-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, EP0-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 5, 2. März 1999 (1999-03-02), Seiten 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims	

 -/---

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 318, 1996, Seiten 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2; ---</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 219, Nr. 3, 1994, Seiten 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ---</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27. Juli 1989 (1989-07-27) Beispiel 21 ---</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15. April 1998 (1998-04-15) das ganze Dokument ---</p>	
P, X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 297, Nr. 5, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument -----</p>	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01873

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9916873 A	08-04-1999	DE 19742706 A AU 1143799 A EP 1017814 A	15-04-1999 23-04-1999 12-07-2000
WO 8906698 A	27-07-1989	DE 3813278 A AT 87665 T DE 58903898 D EP 0324474 A ES 2054883 T HK 116996 A JP 7031194 B JP 1503647 T US 5702888 A US 5344757 A	20-07-1989 15-04-1993 06-05-1993 19-07-1989 16-08-1994 12-07-1996 10-04-1995 07-12-1989 30-12-1997 06-09-1994
EP 0835934 A	15-04-1998	DE 19641876 A	16-04-1998

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75308 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
C07K 14/435, C12N 15/62

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 068.0

8. Juni 1999 (08.06.1999) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01873

(71) Anmelder und

(22) Internationales Anmeldedatum:

8. Juni 2000 (08.06.2000)

(72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SKERRA, Arne [DE/DE]; Max-Lehner-Str. 18,
D-85354 Freising (DE).

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(72) Erfinder; und

(26) Veröffentlichungssprache:

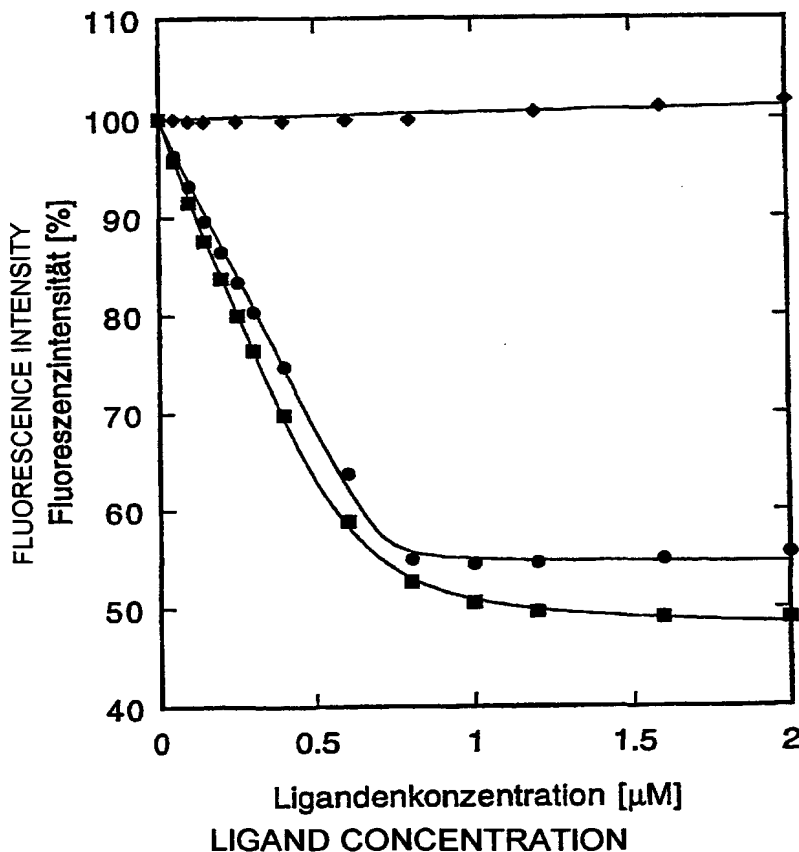
Deutsch

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHLEHUBER, Stef-
fen [DE/DE]; Murstr. 21, D-85356 Freising (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MUTEINS OF BILIN-BINDING PROTEIN

(54) Bezeichnung: MUTEINE DES BILIN-BINDUNGSPROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to muteins of bilin-binding protein with a binding ability to digoxigenin and the fusion proteins of said muteins, a method for preparing said muteins and fusion proteins thereof and to their utilization for detecting or binding digoxigenin-labeled biomolecules. The invention especially relates to a polypeptide selected from the muteins of the bilin-binding protein, which is characterized in that (a) it can bind digoxigenin or digoxigenin conjugates; (b) it does not bind ouabain, testosterone and 4-aminofluorescein (c) at least one of the sequence positions 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 and 127 of the bilin-binding protein has an aminoacid substitution. Due to their simple molecular structure, the inventive muteins provide advantages for production and utilization in comparison with antibodies against the digoxigenin group.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(74) **Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;**
Steinsdorfstr. 6, D-80538 München (DE).

Veröffentlicht:

- *Mit internationalem Recherchenbericht.*
- *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, CA, JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung bezieht sich auf Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag, (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen (28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127) des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist. Aufgrund ihres einfachen molekularen Aufbaus weisen der erfindungsgemässen Muteine bei Herstellung und Verwendung Vorteile im Vergleich zu Antikörpern gegen die Digoxigeningruppe auf.

Muteine des Bilin-Bindungsproteins

Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen.

Die Digoxigeningruppe ist ein heute in der Molekularbiologie weit verbreitetes Instrument für den nichtradioaktiven Nachweis von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen. Zu diesem Zweck wird das Biomolekül mit einem reaktiven Derivat des Digoxigenins meist kovalent modifiziert, was den anschließenden Nachweis des Moleküls mit einem gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörper, bzw. einem Konjugat aus einem entsprechenden Antikörperfragment und einem Reporterenzym, gemäß in der Biochemie allgemein üblichen Methoden gestattet.

Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von reaktiven Digoxigeninderivaten bekannt, die teilweise auch kommerziell erhältlich sind. Beispielsweise eignen sich Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (DIG-NHS), Digoxigenin-3-O-succinyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester und 3-Amino-3-desoxydigoxigenin-hemisuccinamid-succinimidylester zur kovalenten Kopplung mit Proteinen, insbesondere mit den Aminogruppen von exponierten Lysinseitenketten. Mit 3-Iodacetyl-amino-3-desoxydigoxigenin lassen sich vor allem Thiolgruppen in Proteinen oder anderen Biomolekülen selektiv mit der Digoxigeningruppe markieren. Synthetische Oligodesoxy-nukleotide können mit denselben reaktiven Digoxigeninderivaten gekoppelt werden, sofern sie im Verlauf der Synthese mit geeigneten freien Amino- oder Thiolgruppen versehen wurden.

Zur direkten Markierung von Nukleinsäuren eignen sich zudem cis-Platinkomplexe von Digoxigeninderivaten (DIG Chem-Link

Reagent) oder Carbodiimidgruppen enthaltende Digoxigeninderivate (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 806 431 A2). Alternativ ist es im Fall von Desoxyribonukleinsäuren möglich, diese im Verlauf einer matrizenabhängigen enzymatischen Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase und eines mit der Digoxigeningruppe gekoppelten Desoxynukleosidtriphosphats, z.B. Digoxigenin-11-dUTP, Digoxigenin-11-ddUTP oder Digoxigenin-16-dATP, zu markieren. Analog eignet sich Digoxigenin-11-UTP zum Einbau in enzymatisch synthetisierte RNA. Darüber hinaus können Oligodesoxynukleotide direkt bei der automatisierten DNA-Synthese unter Einsatz geeigneter aktivierter Bausteine, z.B. sogenannter "Virtual Nucleotides", mit der Digoxigeningruppe markiert werden. Derartige mit der Digoxigeningruppe gekoppelte Nukleinsäuren eignen sich als nichtradioaktive Sonden zum Nachweis komplementärer Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung, z.B. in Northern oder Southern Blots (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 324 474 A1).

Mit der Digoxigeningruppe markierte Proteine oder Glycoproteine sind insbesondere von Nutzen, um beispielsweise entsprechende Antigene bzw. dagegen gerichtete Antikörper in immunchemischen Testverfahren wie ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) zu bestimmen. Der eigentliche Nachweis des mit der Digoxigeningruppe konjugierten Biomoleküls erfolgt normalerweise mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, in der Regel in der Form eines Konjugats aus dem Fab-Fragment dieses Antikörpers mit einem geeigneten Enzym, wie z.B. der Alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-Peroxidase, als Markierung. Die enzymatische Aktivität dient anschließend zur Quantifizierung durch Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder chemolumineszenten Reaktion. Verschiedene Antikörper gegen die Digoxigeningruppe sind bekannt (Mudgett-Hunter et al., J. Immunol. 129 (1982), 1165-1172; Jeffrey et al., J. Mol. Biol. 248 (1995), 344-360).

Die Verwendung von Antikörpern hat jedoch mehrere Nachteile. So ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Hybridom-

zellkulturen aufwendig, und die Proteolyse zum Fab-Fragment sowie die Produktion von Konjugaten mit Reporterenzymen erfordert zusätzliche schwierige Verfahrensschritte. Aber selbst die gentechnische Gewinnung von Antikörpern ist nicht
5 einfach, was hauptsächlich darin begründet ist, daß sich Antikörper wie auch deren antigenbindende Fragmente in strukturell komplizierter Weise aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen. Bei der gentechnischen Manipulation von Antikörpern müssen deshalb zwei Gene
10 gleichzeitig gehandhabt werden. Außerdem ist die Ausbeute an korrekt gefalteten Antikörperfragmenten bei deren gentechnischer Produktion häufig gering. Wie dem Fachmann bekannt ist, gilt dies umso mehr, wenn rekombinante Fusionsproteine aus Fab-Fragmenten von Antikörpern und Enzymen
15 hergestellt werden sollen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, alternative Polypeptid-Reagenzien zum Nachweis der Digoxigeningruppe zu entwickeln, welche sich auf einfache Weise produzieren lassen.

20 In einem evolutiven Forschungsansatz wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß sich Muteine des strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Bilin-Bindungsproteins (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem.
25 219 (1994), 855-863) eignen, um die Digoxigeningruppe durch Bindung mit hoher Affinität nachzuweisen, wobei die Erkennung des Digoxigenins erstaunlich selektiv gegenüber anderen Steroiden erfolgt.

30 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es
(a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
35 (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
(c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des

Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

Bevorzugt sind dabei Digoxigenin bindende Muteine, die an
zumindest 4 bis 7 oder vorzugsweise zumindest 8 bis 12 der
5 vorstehend definierten Sequenzpositionen eine
Aminosäuresubstitution aufweisen. Ein besonders bevorzugtes
Mutein ist das Polypeptid, das die in SEQ ID NO. 15
dargestellte Aminosäuresequenz besitzt.

10 Außerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35,
36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127
können die Muteine der vorliegenden Erfindung der
Aminosäuresequenz des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris*
brassicae entsprechen. Andererseits kann die Aminosäuresequenz
15 der erfindungsgemäßen Polypeptide auch außerhalb der genannten
Positionen Unterschiede zum Bilin-Bindungsprotein aufweisen.
Derartige Varianten der Sequenz des Bilin-Bindungsproteins
umfassen natürlich vorkommende sowie künstlich erzeugte
Varianten, und unter den Abweichungen werden Substitutionen,
20 Insertionen, Deletionen von Aminosäureresten sowie N- und/oder
C-terminale Additionen verstanden.

Z. B. können die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-
Bindungsproteins Aminosäuresubstitutionen aufweisen, welche
25 eine Oligomerisierung des Bilin-Bindungsproteins vermeiden, wie
die Substitution Asn(1)->Asp, oder um eine proteolytische
Spaltung innerhalb der Polypeptidkette zu unterdrücken, die bei
der Produktion in *E. coli* auftreten kann, z.B. durch die
Substitution Lys(87)->Ser. Weiterhin können in die für die
30 Muteine des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure die
Mutationen Asn(21)->Gln und Lys(135)->Met eingeführt werden, um
beispielsweise die Klonierung eines Genabschnitts über zwei
neue *Bst*XI-Restriktions-schnittstellen an diesen Positionen zu
erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die
35 gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen innerhalb oder
außerhalb der genannten Positionen, um ganz allgemein bestimmte
Eigenschaften des erfindungsgemäßen Muteins zu verbessern, z.B.
seine Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine

Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.

- Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden, kann durch übliche
5 Verfahren, z.B. ELISA, Fluoreszenztitration, Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen oder Blotting-Verfahren, beispielsweise Western-Blotting, Southern-Blotting oder Northern-Blotting, bestimmt werden. Blotting-Methoden können verwendet werden, um Konjugate des Digoxigenins
10 mit Proteinen oder Nukleinsäuren auf eine Membran zu transferieren und diese anschließend mit einem der erfindungsgemäßen Muteine, einem Konjugat dieses Muteins oder einem Fusionsprotein dieses Muteins nachzuweisen.
- 15 Eine quantitative Kenngröße für die Bindungsaffinität liefern etablierte thermodynamische Parameter, wie etwa die Affinitätskonstante oder die Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Mutein und dem gebundenen Liganden, z.B. Digoxigenin. Aber auch eine qualitative Bestimmung der
20 Bindungsfähigkeit ist möglich, z.B. anhand der Intensität eines Bindungssignals aufgrund einer chromogenen Reaktion bzw. eines Farbniederschlags, welcher mit Hilfe einer der genannten Blotting-Methoden erhalten wird.
- 25 Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine sind in einem zweistufigen evolutiven Prozeß erhältlich. Die Zufallsmutagenese des Bilin-Bindungsproteins an mindestens einer, bevorzugt an zumindest 4 bis 7, und besonders bevorzugt an zumindest 8 bis 12 der
30 Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 und die nachfolgende einfache oder vorzugsweise wiederholte Selektion von Muteinen mit Affinität zur Digoxigenin-Gruppe aus dieser Bibliothek, wobei vorzugsweise freies Digoxigenin oder Digitoxinin zur
35 kompetitiven Anreicherung verwendet wird, liefert Muteine des Bilin-Bindungsproteins, die die Digoxigenin-Gruppe erkennen, wobei aber die Affinität noch vergleichsweise niedrig ist. Die erneute Mutagenese eines solchen Muteins an zumindest einer, vorzugsweise zumindest 3 oder 4, oder an allen der

Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37, nun gefolgt von einer einfachen oder vorzugsweise wiederholten Anreicherung durch Komplexbildung mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des gebildeten Komplexes im sauren oder basischen Milieu, führt daraufhin zur Gewinnung von Muteinen mit wesentlich höherer Affinität zur Digoxigeningruppe. Bei dieser Anreicherung liegt die Digoxigeningruppe vorzugsweise als Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat vor.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Affinitätskonstante zwischen solchen erfindungsgemäßen Polypeptiden und Digoxigenin mindestens 10^7 M^{-1} beträgt. Anders ausgedrückt heißt dies, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist. Einzelne Exemplare zeigen sogar Dissoziationskonstanten von 35 nM oder kleiner, wie in den Beispielen ausgeführt ist.

Neben dem Digoxigenin können von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins auch Derivate des Digoxigenins als Ligand gebunden werden, z.B. Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin. Weiterhin können Konjugate dieser chemischen Verbindungen, d. h. mit Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin kovalent oder über einen Metallkomplex verknüpfte Nukleinsäuren, Polypeptide, Kohlenhydrate, andere natürliche oder synthetische Biomoleküle, Makromoleküle oder niedermolekulare Verbindungen, von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins gebunden werden.

Vorzugsweise werden zur Herstellung solcher Konjugate die dem Fachmann bekannten reaktiven Derivate von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin eingesetzt, wie sie beispielsweise weiter oben angegeben sind.

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine, welche durch den beschriebenen zweistufigen Prozeß gewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu Digoxigenin eine noch höhere Affinität zu Digitoxin oder Digitoxigenin, deren Steroidsystem sich bloß

durch das Fehlen einer Hydroxygruppe von dem des Digoxigenins unterscheidet. Überraschenderweise zeigen diese Muteine eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Digoxigenin- bzw. Digitoxigenin-Gruppe, was sich darin ausdrückt, daß andere Steroide oder Steroidgruppen wie Ouabain oder Testosteron mit sehr viel geringerer Affinität, falls überhaupt, gebunden werden. Auch Derivate des Fluoresceins, wie 4-Aminofluorescein, werden offensichtlich nicht gebunden. Damit ist gemeint, daß Ouabain, Testosteron oder 4-Aminofluorescein jeweils eine Dissoziationskonstante von mindestens 10 μM , bevorzugt mindestens 100 μM , gegenüber den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins aufweisen.

In dieser Spezifitätseigenschaft unterscheiden sich diese Muteine erheblich von anderen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins sowie von gegen die Digoxigenin-Gruppe gerichteten Antikörpern, wie z.B. dem Antikörper 26-10 (Chen et al., Protein Eng. 12 (1999), 349-356), welcher Ouabain mit beträchtlicher Affinität bindet, was den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins einen besonderen Vorteil verleiht. Es ist überraschend, daß gerade die zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 zu den bevorzugten Muteinen des Bilin-Bindungsproteins führen. Bevorzugt sind daher solche Muteine, die mindestens eine, vorzugsweise mindestens 3 oder 4 oder alle der Aminosäuresubstitutionen Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile und Glu(37)->Thr tragen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Muteine tragen mindestens eine, mindestens 4 bis 7, oder vorzugsweise mindestens 8 bis 12 der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein. Bei der gewählten Schreibweise ist jeweils zunächst die Aminosäure in dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-

Zugriffscode P09464) zusammen mit der Sequenzposition für das mature Polypeptid in Klammern angegeben, und die entsprechende Aminosäure in einem erfindungsgemäßen Mutein ist nach dem Pfeil genannt. Nochmals besonders bevorzugte Muteine gemäß dieser
5 Erfindung tragen alle der genannten Aminosäuresubstitutionen.

Es ist überraschend, daß die Position 93 des Bilin-Bindungsproteins in den erfindungsgemäßen Muteinen nicht verändert ist, obwohl auch diese Aminosäure von der Mutagenese
10 zur Herstellung der Zufallsbibliothek betroffen war. Bevorzugte Muteine des Bilin-Bindungsproteins tragen daher an dieser Position die Aminosäure Val.

Für bestimmte Nachweisverfahren ist es günstig, die Muteine des
15 Bilin-Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung in markierter Form zu verwenden. Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest eine Markierung trägt. Geeignete Markierungsgruppen sind dem Fachmann bekannt und
20 umfassen Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold. Ganz allgemein ist die Markierung mit Substanzen bzw. Enzymen möglich, die in einer chemischen oder
25 enzymatischen Reaktion einen bestimmbaren Stoff erzeugen. Dabei können alle für Antikörper bekannten Markierungen auch an die erfindungsgemäßen Muteine gekoppelt werden.

Eine für die praktische Anwendung besonders vorteilhafte
30 Möglichkeit besteht darin, die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins in der Form von Fusionsproteinen zu verwenden. Techniken zur Herstellung solcher Fusionsproteine mittels gentechnischer Methoden sind dem Fachmann bekannt. Geeignete Fusionspartner für die erfindungsgemäßen Muteine
35 wären Enzyme und andere Polypeptide, Proteine oder Proteindomänen. Derartige Fusionen wären geeignet, um dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins zusätzliche Eigenschaften zu vermitteln, wie z.B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu

anderen Molekülen, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Liganden.

Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-Bindungsdomäne oder die Immunglobulin-Bindungsdomäne von Protein G oder Protein A, Antikörperfragmente, Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder andere Bindungsproteine und deren funktionelle Bestandteile sowie Affinitätspeptide, wie z.B. das Strep-Tag oder das Strep-Tag II (Schmidt et al., J. Mol. Biol. 255 (1996), 753-766). Auch Proteine mit besonderen chromogenen oder fluorogenen Eigenschaften, wie z.B. das grün fluoreszierende Protein, eignen sich als Fusionspartner. Weiterhin käme das Hüllprotein III eines filamentösen Bakteriophagen, wie M13, f1 oder fd, oder ein Fragment dieses Hüllproteins als Fusionspartner in Frage.

Unter dem Begriff Fusionsproteine sollen hier ganz allgemein auch solche erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins verstanden werden, die mit einer Signalsequenz ausgestattet sind. Signalsequenzen am N-Terminus des erfindungsgemäßen Polypeptids können dazu dienen, dieses bei der Biosynthese in ein bestimmtes Zellkompartiment, z.B. das Periplasma von *E. coli* oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle, bzw. in das die Zelle umgebende Medium zu dirigieren. Dabei wird die Signalsequenz normalerweise von einer Signalpeptidase abgespalten. Außerdem können andere Signal- bzw. Targeting-Sequenzen verwendet werden, die nicht unbedingt am N-Terminus des Polypeptids angebracht sein müssen, und die dessen Lokalisierung in speziellen Zellkompartimenten ermöglichen. Eine bevorzugte Signalsequenz zur Sekretion in das Periplasma von *E. coli* ist die OmpA-Signalsequenz. Weitere Signalsequenzen sowie Targeting-Sequenzen sind im Stand der Technik in großer Zahl bekannt.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins besteht darin, daß sich sowohl deren N-Terminus als auch deren C-Terminus zur Herstellung von Fusionsproteinen eignet. Im Gegensatz zu Antikörpern, bei denen sich der N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinkette in räumlicher Nähe zur Antigenbindungsstelle befinden, können bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden beide Enden der Polypeptidkette zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, ohne daß die Bindung des Liganden beeinträchtigt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist. Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung sind Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins oder von Fusionsproteinen mit dem Aminoterminus von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

Ein bevorzugtes Enzym zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine ist die bakterielle Alkalische Phosphatase (Sowadski et al., J. Mol. Biol. 186 (1985) 417-433). Diese kann einerseits am N-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins oder am C-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins angebracht sein. Zusätzlich kann ein solches Fusionsprotein eine Signalsequenz tragen, wie z.B. OmpA oder PhoA, die dessen Sekretion in das Periplasma von *E. coli* bewirkt, wo sich die Disulfidbindungen in der Polypeptidkette effizient ausbilden können. Weiterhin kann es mit einem Affinitätspeptid ausgestattet sein, wie z.B. dem Strep-Tag II, welches dessen einfache Reinigung erlaubt. Spezifische erfindungsgemäße Fusionsproteine sind in den Beispielen beschrieben. Ein Vorteil eines derartigen Fusionsproteins

besteht darin, daß es direkt eine chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Nachweisreaktion katalysieren kann, was seinen Einsatz zur Detektion der Digoxigenin-Gruppe vereinfacht.

5 Ein weiterer Vorteil der Verwendung der Alkalischen Phosphatase zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine besteht darin, daß dieses Enzym zu einem stabilen Homodimer assoziiert und demzufolge dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins als Bestandteil des Fusionsproteins die Eigenschaft der Bivalenz
10 verleiht. Auf diese Weise kann bei der Bindung der Digoxigenin-Gruppe ein Aviditätseffekt resultieren, der die Nachweisempfindlichkeit steigert. Ein solcher Aviditätseffekt ist insbesondere zu erwarten, wenn das mit Digoxigenin markierte Molekül an einer festen Phase adsorbiert ist, in
15 oligomerer bzw. membrangebundener Form vorliegt oder mit mehreren Digoxigenin-Gruppen konjugiert ist. Andere homodimere Enzyme eignen sich analog zur Herstellung bivalenter Fusionsproteine mit den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins.

20 Abgesehen von der bakteriellen Alkalischen Phosphatase können auch Phosphatasen aus eukaryontischen Organismen, wie z.B. die kalbsintestinale Phosphatase (CIP), zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwendet werden. Diese
25 zeichnen sich oftmals durch höhere enzymatische Aktivität aus (Murphy und Kantrowitz, Mol. Microbiol. 12 (1994), 351-357), was eine größere Nachweisempfindlichkeit bewirken kann. Auch Mutanten der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit verbesserter katalytischer Aktivität (Mandecki et al., Protein
30 Eng. 4 (1991), 801-804) lassen sich zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwenden. Weiterhin eignen sich andere dem Fachmann bekannte Enzyme, welche chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Reaktionen katalysieren, wie z.B. die β -Galactosidase oder die Meerrettich-Peroxidase, zur
35 Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine. All diese Enzyme können darüber hinaus ebenso zur Markierung von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins eingesetzt werden, indem sie z.B. unter Verwendung üblicher Kopplungsreagenzien mit dem separat

gewonnenen Mutein oder einem Fusionsprotein des Muteins konjugiert werden.

Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung
5 eine Nukleinsäure, die eine für ein Mutein oder ein
Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins
kodierende Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil
eines Vektors sein, auf dem eine operativ funktionelle Umgebung
zur Expression der Nukleinsäure gegeben ist. Geeignete Vektoren
10 sind in großer Zahl aus dem Stand der Technik bekannt und
werden hierin nicht ausführlich beschrieben. Unter einer
operativ funktionellen Umgebung werden solche Elemente
verstanden, die die Transkription und/oder nachfolgende
Prozessierung einer mRNA ermöglichen, begünstigen, erleichtern
15 und/oder erhöhen. Beispiele für derartige Elemente sind etwa
Promotoren, Enhancer, Transkriptionsinitiationsstellen und -
terminationsstellen, Translationsinitiationsstellen,
Polyadenylierungssignale etc. In einer bevorzugten
Ausführungsform umfassen solche erfindungsgemäßen Nukleinsäuren
20 eine Nukleinsäuresequenz, die die in SEQ ID NO. 15 dargestellte
Polypeptidsequenz codiert. Aufgrund der Degeneriertheit des
genetischen Codes ist es für den Fachmann klar, daß dabei die
in SEQ ID NO. 15 angegebene Nukleotidsequenz nur eine einzige
aus der Gruppe der das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15
25 codierenden Nukleotidsequenzen darstellt.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ihre Umgebung kann dabei
dergestalt sein, daß die Biosynthese des Polypeptids im Cytosol
erfolgt, wobei der Polypeptidsequenz ggf. ein Start-Methionin
30 vorangestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird
dagegen eine N-terminale Signalsequenz verwendet, insbesondere
die OmpA- oder die PhoA-Signalsequenz, um das erfindungsgemäße
Polypeptid in das Periplasma von *E. coli* zu dirigieren, wo die
Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten wird und sich
35 die Polypeptidkette unter oxidativer Ausbildung der
Disulfidbindungen falten kann. Eukaryontische Signalsequenzen
können Verwendung finden, um das erfindungsgemäße Polypeptid in
einem eukaryontischen Wirtsorganismus zu sekretieren.

Grundsätzlich kommen zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure sowohl prokaryontische, bevorzugt *E. coli*, als auch eukaryontische Zellen wie z.B. Hefen in Betracht.

- 5 Unter einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Muteins oder Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. In der Regel wird dazu zunächst eine geeignete Wirtszelle mit einem Vektor, der eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäure umfaßt, transformiert. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Biosynthese des Polypeptids erfolgt, und das erfindungsgemäße Polypeptid wird gewonnen.
- 10
- 20 Bezüglich des Herstellungsverfahrens ist zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins zwei strukturelle Disulfidbindungen aufweisen, und daß in entsprechenden Fusionsproteinen ggf. zusätzliche Disulfidbindungen vorliegen. Die mit der Proteinfaltung einhergehende Ausbildung dieser Disulfidbindungen ist in der Regel gewährleistet, wenn das erfindungsgemäße Polypeptid mit Hilfe einer geeigneten Signalsequenz in ein Zellkompartiment mit oxidierendem Thiol/Disulfid-Redoxmilieu dirigiert wird, beispielsweise das bakterielle Periplasma oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle. Das erfindungsgemäße Polypeptid läßt sich dabei durch Zellfraktionierung freisetzen oder aus dem Kulturüberstand gewinnen. Ggf. läßt sich die Faltungseffizienz durch Überproduktion von Protein-Disulfidisomerasen, wie z.B. dem DsbC-Protein von *E. coli*, oder von Faltungs-Hilfsproteinen steigern.
- 30
- 35

Andererseits ist es möglich, ein erfindungsgemäßes Polypeptid

im Cytosol einer Wirtszelle, bevorzugt *E. coli*, zu produzieren. Es kann dann z.B. in Form von Einschußkörpern gewonnen und anschließend *in vitro* renaturiert werden. Je nach Verwendungszweck kann das Protein mittels verschiedener dem Fachmann bekannter Methoden gereinigt werden. Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins eignet sich z.B. die Affinitätschromatographie mit einem Säulenmaterial, welches Digoxigeningruppen trägt. Zur Reinigung von Fusionsproteinen der Muteine des Bilin-Bindungsproteins können die aus dem Stand der Technik bekannten Affinitätseigenschaften des Fusionsproteins ausgenutzt werden, z.B. die des Strep-Tags oder des Strep-Tags II (Schmidt und Skerra, J. Chromatogr. A 676 (1994), 337-345; Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), die der Albumin-Bindungsdomäne (Nygren et al., J. Mol. Recogn. 1 (1988), 69-74) oder die der Alkalischen Phosphatase (McCafferty et al., Protein Eng. 4 (1991) 955-961). Bei den Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Tatsache, daß die Muteine des Bilin-Bindungsproteins nur aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehen, von Vorteil, da weder dafür zu sorgen ist, daß mehrere verschiedene Polypeptidketten gleichzeitig innerhalb einer Zelle synthetisiert werden müssen, noch, daß unterschiedliche Polypeptidketten in funktioneller Weise miteinander assoziieren.

Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten für die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins entsprechen im wesentlichen denjenigen herkömmlicher Antikörper oder Antikörperfragmente mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin. Demnach betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins in einem Verfahren zum Nachweis, zur Bestimmung, zur Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins oder ihrer Fusionsproteine in Nachweisverfahren kann im wesentlichen analog zu den entsprechenden Nachweisverfahren erfolgen, die für Antikörper gegen Digoxigenin, sowie deren Fragmente und/oder Konjugate, bekannt sind. Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

Zu diesem Zweck kann das Mutein direkt, z.B. durch kovalente Kopplung, markiert sein. Aber auch indirekte Markierungen, z.B. mittels markierter Antikörper gegen das Bilin-Bindungsprotein oder dessen Muteine oder gegen Domänen von Fusionsproteinen dieser Muteine, können eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung erfindungsgemäßer Fusionsproteine mit einem Enzym, z.B. der Alkalischen Phosphatase, anstelle eines markierten Muteins des Bilin-Bindungsproteins. In diesem Fall läßt sich das Bestimmungsverfahren mit einer besonders geringen Zahl von Verfahrensschritten gestalten, wobei z.B. die Fähigkeit zur Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder lumineszenten Nachweisreaktion durch das Enzym als Bestandteil des Fusionsproteins unmittelbar ausgenutzt werden kann. Die leichte Verfügbarkeit solcher Fusionsproteine stellt hierbei einen besonderen Vorteil im Vergleich zu entsprechenden Fusionsproteinen herkömmlicher Antikörper dar. Die Ausnutzung des oben beschriebenen Aviditätseffekts im Fall eines oligomeren Fusionsproteins stellt einen weiteren Vorteil bei einem solchen Verfahren dar.

Ein Bestimmungsverfahren für die Digoxigeningruppe kann z.B. qualitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Nukleinsäuren in Southern- bzw. Northern-Blots

- oder von mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Proteinen in Western-Blots durchgeführt werden. Ein Bestimmungsverfahren kann auch quantitativ zum Nachweis von mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Proteinen im ELISA durchgeführt werden. Zudem eignet sich ein erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren zum indirekten Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Proteinen oder anderen Molekülen unter Verwendung eines gegen das Protein oder Molekül gerichteten Bindungsproteins, z.B. eines Antikörpers bzw. seines Fragments, welches mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert ist. Auch der indirekte Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Nukleinsäuren unter Verwendung einer mit dieser Nukleinsäure hybridisierenden Sonde, welche mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert ist, ist möglich. Eine Anwendung in der medizinischen Diagnostik oder Therapie ergibt sich zudem bei der Bestimmung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin, ohne daß diese Liganden mit einem anderen Molekül konjugiert sein müssen.
- Die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine können auch zur Immobilisierung eines mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Moleküls verwendet werden. Diese Immobilisierung erfolgt vorzugsweise an mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen beschichteten Festphasen, wie etwa Mikrotiterplatten, Immunosticks, Mikrobeads aus organischen, anorganischen oder paramagnetischen Materialien oder Sensoroberflächen.
- Dementsprechend können die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine ebenfalls zur Abtrennung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin oder eines mit einer dieser Verbindungen konjugierten Moleküls verwendet werden. In diesem Fall kommen neben den genannten Festphasen auch Säulenmaterialien zur Beschichtung mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen in Betracht. Vorzugsweise kann diese Beschichtung durch Kopplung mittels chemisch reaktiver Gruppen auf geeigneten Säulenmaterialien erfolgen. Derartig beschichtete Säulenmaterialien können zur Abtrennung von mit

Digoxigenin-Gruppen konjugierten Substanzen sowie ggf. von Komplexen aus solchen Substanzen mit anderen Molekülen aus einer Lösung verwendet werden.

- 5 Beispielsweise können so Antigene aus einer Lösung abgetrennt werden, indem die Lösung mit Antikörpern versetzt wird, welche gegen die Antigene gerichtet und mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert sind, und die erhaltene Lösung mit dem genannten Säulenmaterial unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, 10 unter denen eine Komplexbildung zwischen den Digoxigenin-Gruppen und einem erfindungsgemäßen Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder seinem Fusionsprotein erfolgt. Ggf. ist im Anschluß an eine solche Abtrennung auch eine Elution der mit Digoxigenin konjugierten Substanz möglich. Diese Elution kann durch 15 Konkurrenz mit Digoxin, Digoxigenin, Digitoxin oder Digitoxigenin erfolgen sowie z.B. durch Absenkung oder Erhöhung des pH-Werts der Lösung. Bei einer kompetitiven Elution kann dabei die höhere Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Muteine zu Digitoxigenin oder Digitoxin im Vergleich zur 20 Digoxigenin-Gruppe in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden. Auf diese Weise läßt sich eine mit Digoxigenin konjugierte Substanz isolieren oder reinigen.

Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die 25 nachstehenden Beispiele und die beigefügten Zeichnungen, in denen:

Figur 1 jeweils eine Fluoreszenztitration des mit dem Strep-tag II fusionierten Muteins DigA16 mit den Liganden 30 Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain wiedergibt;

Figur 2 die Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B) zur Herstellung von Fusionsproteinen des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase schematisch darstellt; 35

Figur 3 den quantitativen Nachweis von mit Digoxigenin-Gruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase in einem

ELISA demonstriert;

Figur 4 den qualitativen Nachweis von mit Digoxigenin-Gruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase auf einem Western-Blot zeigt.

Figur 1 zeigt die graphische Darstellung von Ergebnissen aus Beispiel 3, bei der eine 1 μ M Lösung des Muteins DigA16 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Steroide Digoxigenin (Quadrate), Digitoxigenin (Kreise) und Ouabain (Rauten) versetzt wurde. Die jeweiligen Proteinfluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm gemessen und gegen die aktuelle Gesamtkonzentration des Steroids im jeweiligen Ansatz aufgetragen. Die Datenpunkte wurden schließlich mittels nicht linearer Regression durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

Figur 2 zeigt eine Zeichnung der Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B). pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit ihrer eigenen Signalsequenz, einem Peptid-Linker mit der Sequenz Pro-Pro-Ser-Ala, dem Mutein DigA16 sowie dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Das entsprechende Strukturgen wird von dem *dsbC*-Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., Biochemistry 34 (1995), 5075-5089) als zweitem Cistron gefolgt. Das dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P/O}$) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische Region des filamentösen Bakteriophagen f1 (*f1-IG*), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, dem Mutein DigA16, dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel, einem Peptid-Verbindungsstück bestehend aus fünf Glycinresten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase ohne ihre N-terminale

Aminosäure Arginin. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereiches sind mit dem Vektor pBBP27 identisch.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 4, in dem der quantitative Nachweis von Digoxigeningruppen mit Hilfe der Fusionsproteine des Muteins DigA16 als Genprodukt der Vektoren pBBP27 (geschlossene Symbole) und pBBP29 (offene Symbole) geführt wurde. Hierbei waren die Digoxigeningruppen einerseits an Rinder-Serumalbumin (BSA, Quadrate) oder andererseits an Albumin aus Hühner-Ei (Ovalbumin, Dreiecke) gekoppelt. Als Kontrolle sind die Daten dargestellt, die bei der Verwendung von underivatisiertem Rinder-Serumalbumin sowie dem Fusionsprotein kodiert von pBBP27 erhalten wurden (offene Kreise). Die dem jeweiligen gebundenen Fusionsprotein entsprechende enzymatische Aktivität wurde anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) mittels der Gleichung

$$[P \bullet L] = [L]_t [P]_t / (K_d + [P]_t) .$$

Hierbei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten Gesamtkonzentration des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \bullet L]$ wird anhand der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die innerhalb einer Konzentrationsreihe konstante Gesamtkonzentration der Digoxigeningruppen $[L]_t$ je Vertiefung sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden durch nicht lineare Regression als Parameter angepaßt.

Figur 4 zeigt das Ergebnis eines Western Blot-Experiments aus Beispiel 4 zum qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen mittels der von pBBP27 (Spuren 1 und 2) sowie von pBBP29 (Spuren 3 und 4) kodierten Fusionsproteine des Muteins DigA16. Zum Vergleich ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel der

Biomoleküle ebenfalls dargestellt (Spuren 5 und 6). Hierbei wurde in den Spuren 1, 3 und 5 jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg underivatisiertem BSA, underivatisiertem Ovalbumin und underivatisierter RNaseA aufgetrennt. In den Spuren 2, 4 und 6 wurde jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg mit Digoxigeningruppen gekoppeltem BSA, mit Digoxigeningruppen gekoppeltem Ovalbumin und mit Digoxigeningruppen gekoppelter RNaseA aufgetrennt.

Beispiele

Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z.B. in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.

Beispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins, Phagemidpräsentation und Selektion eines Muteins mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurden dessen Aminosäure-Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer konzertierten Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mehreren Schritten unterworfen. Die PCR-Reaktionen wurden zunächst in zwei getrennten Amplifizierungsschritten in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt, wobei 10 ng pBBP20-Phasmid-DNA (SEQ ID NO:1) als Matrize sowie jeweils 25 pmol zweier Primer (SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 in einem Ansatz und SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 in einem zweiten Ansatz), welche nach der allgemein bekannten Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt wurden.

Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren

Thermostatisierblock für 2 min auf 94°C erhitzt. Anschließend wurden 2,5 u Taq DNA-Polymerase (5 u/ μ l, Promega) zugegeben und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1,5 min bei 72°C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei 60°C, durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco BRL) isoliert.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierte Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines *Xba*I-Überhangs mit einem dazu komplementären *Spe*I-Überhang erhalten wurde, und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100 μ l-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng der beiden isolierten Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des Oligodesoxynukleotids SEQ ID NO:8 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60°C. Das erhaltene Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der Muteine in Form einer Mischung von Nukleinsäuren repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments

(335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit BstXI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

5

Zur Ligierung wurden 0,93 µg (4,2 pmol) des PCR-Fragments und 11 µg (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für zwei Tage bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20°C für drei Tage wurde zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 µl TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Vergleich mit einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Präparation elektrokompenter Zellen des *E. coli* K12-Stamms XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-379) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11 (1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtskultur auf eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und bei 200 Upm und 26°C in einem 3 l-Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils 500 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio) mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 µl der oben beschriebenen DNA-Lösung (245 ng/µl) wurde mit 40 µl der Zellsuspension gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvette überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei 3600 g sedimentiert, in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 µl auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 µg der ligierten DNA wurden auf diese Weise mit acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanten erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren.

Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die so erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm geschüttelt. 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,88 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 1,0 lag. Diese Kultur wurde für 6 h bei 37°C, 160 Upm bis zu einer stationären Zelldichte inkubiert und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 100 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von rekombinanten Phagemiden (Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press), welche die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusion mit dem verkürzten Hüllprotein pIII tragen, wurde die so gewonnene Phasmid-DNA zur Transformation elektrokompenter Zellen von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Elektroporation wurde wie oben beschrieben mit

Hilfe des Easyjec T Basic Systems durchgeführt. In insgesamt 13 Ansätzen wurden je 40 μ l der Zellsuspension elektrokompeter Zellen mit jeweils 2 μ g der DNA in einem Volumen von 5 μ l transformiert. Nach der Elektroporation wurde die erhaltene
5 Zellsuspension aus jedem Ansatz sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt.

Diese Ansätze wurden vereinigt (Volumen = 26 ml), mit 74 ml
10 2xYT-Medium und mit 100 μ l Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l) versetzt. Durch Ausplattieren von 100 μ l einer 1:10⁵-Verdünnung der erhaltenen Suspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanten zu $1,1 \cdot 10^{10}$ abgeschätzt. Nach
15 Inkubation für 60 min bei 37°C und 160 Upm wurde die Kultur mit 500 μ l VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 60 min bei 37°C, 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 200 μ l Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur
20 auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (50 μ l einer 50 μ g/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26°C, 160 Upm inkubiert.

25

Zwecks Abtrennung der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 12000 g, 4°C). Der Überstand, der die Phagemidpartikel enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 μ m), mit 1/4 Volumen (25 ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht
30 bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 g, 4°C) wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 4 ml kaltem PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zu gleichen Volumina auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt.
35 Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 18500 g, 4°C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen (jeweils 0,25 ml pro Reaktionsgefäß) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4°C) wurde der Überstand
5 entfernt, und die präzipitierten Phagemidpartikel wurden in jeweils 0,5 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung zur Klärung noch einmal zentrifugiert (5 min, 18500 g, 4°C). Der Überstand mit den Phagemidpartikeln (zwischen $1 \cdot 10^{12}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) wurde anschließend für die
10 Affinitätsanreicherung eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung der die Muteine des Bilin-Bindungsproteins präsentierenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800
15 μ l eines Konjugats (100 μ g/ml) aus Ribonuclease A (RNaseA) und Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugats wurden 1,46 μ mol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-
20 hydroxysuccinimidester (DIG-NHS, Boehringer Mannheim) in 25 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 0,73 μ mol (10 mg) RNaseA (Fluka) in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde
25 überschüssiges Reagenz von dem RNaseA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit
30 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 μ l der Phagemidlösung und 500 μ l Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei
35 RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde die Lösung abgezogen und der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 μ l PBST

für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 μ l einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg Digoxigenin (Fluka) wurden hierzu in 19,2 μ l DMF gelöst und zu 5 930,8 μ l PBS gegeben) kompetitiv eluiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurden die 950 μ l Lösung der erhaltenen Elutionsfraktion (je nach Selektionszyklus zwischen 10^6 und 10^8 Colony-forming Units) kurz auf 37°C erwärmt, mit 4 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue ($OD_{550} = 0,5$) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischen 2xYT-Mediums resuspendiert und auf vier Agar-Platten 15 mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm 20 geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß 25 die Zelldichte OD_{550} bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ inkubiert, mit 250 μ l VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert, und es wurde weiter verfahren wie bereits oben beschrieben.

30

Mit den aus der ersten Affinitätsanreicherung erhaltenen Phagemiden wurden nacheinander acht weitere Anreicherungszyklen mit Immuno-Sticks, welche frisch mit dem Digoxigenin-RNaseA-Konjugat beschichtet waren, durchgeführt. Die nach dem letzten 35 Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Mischung der erhaltenen Kolonien wurde, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert. Mit

dieser Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

- 5 Um die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem Strep-tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne produzieren zu können, wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in den Vektor pBBP22 subkloniert. Ein relevanter Ausschnitt aus der
- 10 Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:9 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem
- 15 Vektor pASK75.

Dazu wurde die aus der Mischung der *E. coli*-Kolonien isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative

20 Agarose-Gelelektrophorese wie oben beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

- 25 Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l dieses Ligierungsansatzes wurden 200 μ l kompetente Zellen des
- 30 Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert (Sambrook et al., supra), wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.

Die Transformanten wurden anschließend mittels eines Colony

35 Screening Assays auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe durchgemustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-

Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 μm) aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 μl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurecht-geschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 μm) nach den Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 $\mu\text{g/l}$ Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 $\mu\text{g/l}$ Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22°C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Muteine als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4°C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml einer Lösung von 10 $\mu\text{g/ml}$ eines Konjugates von BSA mit Digoxigenin in PBST inkubiert.

Zur Herstellung des Konjugates von BSA (Sigma) und Digoxigenin

wurde eine Lösung von 3,0 μmol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 μl DMSO μl -weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Um gebundenes Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach zweimaligem Waschen in 20 ml PBST für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml PBST und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl_2) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, Roth, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Dimethylformamid) und 5 μl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Muteine des Bilin-Bindungsproteins, in Form der Fusionsproteine mit dem Strep-tag und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Vier der Kolonien von der oberen Membran, welche zu einem aufgeprägten Farbsignal Anlaß gaben, wurden zur Herstellung von Kulturen in LB/Amp-Medium mit einem Volumen von 4 ml verwendet. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert, und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11. Dabei wurde gefunden, daß alle vier untersuchten Plasmide die gleiche Nukleotidsequenz trugen. Das entsprechende Genprodukt wurde als DigA bezeichnet (SEQ ID NO:12). Die

Nukleotidsequenz von DigA wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt und ist im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

5 Beispiel 2: Partielle Zufallsmutagenese des Muteins DigA und Selektion von Muteinen mit verbesserter Bindungsaffinität zu Digoxigenin

10 Zur Verbesserung der Affinität zwischen dem Mutein DigA und Digoxigenin, welche gemäß Beispiel 3 zu 295 ± 36 nM bestimmt wurde, wurden die 6 Aminosäurepositionen 28, 31 und 34-37 in DigA für eine weitergehende partielle Zufallsmutagenese ausgewählt.

15 Zur Mutagenese dieser Positionen wurde die PCR mit einem degenerierten Oligodesoxynukleotid-Primer durchgeführt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l, wobei 2 ng der für DigA (SEQ ID NO:12) kodierenden Plasmid-DNA des Vektors pBBP22 als Matrize eingesetzt wurden. Der
20 Reaktionsansatz enthielt 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:13 und SEQ ID NO:7 sowie die restlichen Komponenten gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 65°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für
25 5 min bei 60°C. Das erhaltene DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit *Bst*XI nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des resultierenden DNA-Fragmentes von 335 bp Länge erfolgte wiederum durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.

30

Entsprechend wurde die DNA des Vektors pBBP24 mit *Bst*XI geschnitten und das erhaltene Fragment von 4028 bp isoliert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP24 ist mit der kodierte Aminosäuresequenz im
35 Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:14 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75. pBBP24 ist weitestgehend

identisch mit pBBP20 wobei das BBP-Gen mittels entsprechend eingeführter Stopp-Kodons inaktiviert ist.

Zur Ligierung wurden 1,3 µg des geschnittenen DNA-Fragmentes
5 aus der PCR und 16,0 µg des Fragmentes von pBBP24 in Gegenwart
von 120 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in
einem Gesamtvolumen von 600 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM
MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für 18 h bei 16°C
inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24
10 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer
Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt
wurden. Nach Inkubation bei -20°C für zwei Wochen wurde
zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit
jeweils 150 µl Ethanol (70 % v/v, -20°C) gewaschen und unter
15 Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 80 µl TE/10
aufgenommen.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit der
ligierten DNA durch Elektroporation wurde gemäß der in Beispiel
20 1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei in 16
Ansätzen jeweils 40 µl Zellsuspension elektrokompenter Zellen
mit 5 µl der DNA-Lösung gemischt wurden. Nach der
Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2 ml frischem,
eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200
25 Upm geschüttelt.

Die vereinigten Suspensionen wurden mit 168 ml 2xYT-Medium und
mit 200 µl Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml,
Endkonzentration 100 mg/l). Durch Ausplattieren von 100 µl
30 einer 1:10⁴-Verdünnung der erhaltenen Zellsuspension auf Agar-
Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen
Transformanten zu 1,48•10⁹ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60
min bei 37°C und 160 Upm wurden die Transformanten mit 4 ml
VCS-M13 Helferphage (6,3•10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert und
35 für weitere 30 min bei 37°C und 160 Upm geschüttelt.
Anschließend wurden 400 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml,
Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur
auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der

Genexpression Anhydrotetracyclin (100 μ l einer 50 μ g/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26°C und 160 Upm inkubiert. Die
5 Abtrennung der Zellen und die Reinigung der Phagemide durch Fällung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Zur Affinitätsanreicherung aus der Bibliothek der Phagemide, welche das partiell mutierte Mutein DigA präsentierten, wurden
10 mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

Zur Herstellung eines Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin und Biotin wurden 1,5 μ mol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 μ l DMSO und 1,5 μ mol (0,68 mg) D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (Boehringer Mannheim) in 12,5 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der
20 Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrations-säule nach den Angaben des Herstellers von dem Doppelkonjugat abgetrennt.

25 Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 μ l einer 0,5 μ M Lösung des Doppelkonjugats (33,5 μ g/ml) in PBS mit 260 μ l einer Lösung der frisch präparierten Phagemide (zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß Komplexbildung zwischen der Digoxigenin-Gruppe und den
30 von den Phagemiden präsentierten Muteinen eintreten konnte. Anschließend wurde 100 μ l einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.

Parallel wurden 100 μ l der kommerziell erhältlichen Suspension
35 der paramagnetischen Partikel dreimal mit jeweils 100 μ l PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml Eppendorfgefäßes für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des

Eppendorfgefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 μ l 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die paramagnetischen Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 μ l einer Lösung von 4 μ M D-Desthiobiotin (Sigma) in PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhindert, dass das Strep-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Muteinen und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex bilden konnte.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBST unter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 140 μ l 0,5 M Tris neutralisiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurde die erhaltene Elutionsfraktion entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 1 mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue ($OD_{550} = 0,5$) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischem 2xYT-Medium resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm

geschüttelt.

- Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert und mit 300 µl VCS-M13 Helferphage ($6,3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Affinitätsselektion mit den paramagnetischen Partikeln und dem Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat unter den oben angegebenen Bedingungen. Auf diese Weise wurden insgesamt 4 Selektionszyklen durchgeführt.
- Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Mit der Mischung der erhaltenen Kolonien, die, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert worden waren, wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

- Anschließend wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen wie in Beispiel 1 aus dem Vektor pBBP24 in den Vektor pBBP22 subkloniert und kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert. Die Transformanten wurden schließlich wiederum gemäß Beispiel 1 auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe mittels des Colony Screening Assays durchgemustert.

- Sieben der Kolonien, die im Colony Screening Assay eine starke Signalintensität aufwiesen, wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde wie in Beispiel 1 einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß alle

untersuchten Plasmide unterschiedliche Sequenzen besaßen. Nach Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wiesen sechs der sieben untersuchten Varianten ein Amber Stopp-Kodon an der Aminosäureposition 28 auf. Dieses Stopp-Kodon wurde allerdings bei der Wahl geeigneter Amber-Suppressorstämme, wie zum Beispiel *E. coli* XL1-Blue oder TG1-F⁻, zumindest teilweise supprimiert und statt dessen als Glutamin translatiert. Somit wurde sowohl im Verlauf der Affinitätsanreicherung als auch beim Colony Screening Assay funktionelles Protein in voller Länge produziert.

Als einziges unter den gefundenen Muteinen wies das Mutein mit der SEQ ID NO:15 kein Amber-Stoppkodon auf, so daß es sich zur bakteriellen Produktion besonders gut eignete. Dieses Mutein, auch als DigA16 bezeichnet, wurde demzufolge hinsichtlich seiner Bindefähigkeit für die Digoxigeningruppe genauer charakterisiert.

Beispiel 3: Produktion der Muteine DigA und DigA16 und Ermittlung ihrer Affinität für Digoxigenin und dessen Derivate durch Fluoreszenztitration

Zur präparativen Produktion der aus den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurde der kodierende Genabschnitt zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor des Typs pBBP22 in das Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Das dabei erhaltene Plasmid kodierte für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, gefolgt von dem Mutein und dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:16 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem aufgefüllten *Hind*III-Strangende erhalten wurde, wobei

die ursprüngliche HindIII-Schnittstelle verloren ging. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

- 5 Zur Subklonierung wurde die für das jeweilige Mutein kodierende Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21
10 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

- Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM
15 $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und für 16 h bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l des Ligierungsansatzes wurde dann *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119) nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert, wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten
20 wurden. Von dieser Suspension wurden 100 μ l auf einer Agar-Platte mit LB/Amp-Medium ausplattiert und für 14 h bei 37°C inkubiert.

- Zur Proteinproduktion wurde eine der erhaltenen Einzelkolonien
25 ausgewählt, eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) damit angeimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 40 ml der Vorkultur wurden auf 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22°C und 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$
30 wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 μ g/l Anhydrotetracyclin (200 μ l einer 2 mg/ml-StammLösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22°C, 200 Upm geschüttelt.

- Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4°C) und
35 nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml Periplasma-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinander-

folgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15 min, 4420 g, 4°C und 15 min, 30000 g, 4°C). Der so gewonnene periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert, 5 sterilfiltriert und zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der Muteine fusionierten Strep-tag II-Affinitätsanhangsels (Schmidt 10 und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 109-122). Im vorliegenden Fall wurde das Streptavidinmutein "1" eingesetzt (Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), welches (mit 5 mg/ml immobilisiertem Streptavidin, bezogen auf das Bettvolumen der Matrix) an eine aktivierte Sepharose gekoppelt war.

15 Eine mit 2 ml dieses Materials befüllte Chromatographiesäule wurde bei 4°C und einer Flußrate von 20 ml/h mit 10 ml SA-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem Durchfluß- 20 Photometer verfolgt. Nach dem Auftragen des periplasmatischen Proteinextrakts wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-Puffer gewaschen. Gebundenes Mutein wurde anschließend mit 10 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) in SA-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das gereinigte Mutein enthielten, 25 wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fling und Gregerson, Anal. Biochem. 155 (1986), 83-88) überprüft und vereinigt. Die Proteinausbeuten lagen zwischen 200 µg und 800 µg je 2 l Kultur.

30 Die Liganden-Bindungseigenschaften der Muteine DigA, DigA16 sowie des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins (SEQ ID NO:16) wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und/oder Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung 35 mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Als

Liganden wurden Digoxigenin (Fluka), Digoxin (Fluka), Digitoxigenin (Fluka), Digitoxin (Fluka), Testosteron (Sigma), Ouabain (Fluka) sowie 4-Aminofluorescein (Fluka) eingesetzt. Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine
5 signifikante Eigenfluoreszenz oder Absorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA. Die Lösung des jeweiligen gereinigten Muteins wurde viermal gegen diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine
10 Konzentration von 1 μM eingestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 μm , Sarstedt). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktions-
15 koeffizienten von 53580 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für DigA und DigA16 (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group). Für Bbp wurde der nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326) in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierte kalkulatorische Extinktionskoeffizient von 54150 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ verwendet.

20 Zur Messung wurden 2 ml der Muteinlösung in einer Quarzküvette, die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25°C temperiert. Anschließend wurden insgesamt 40 μl einer 100 μM bis 500 μM Lösung des
Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μl bis 4 μl
25 zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als
30 Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß
35 folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt.

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_d) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

- 5 Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt. $[P]_t$ als die Konzentration des Muteins, f_{PL} als Fluoreszenzkoeffizient des Mutein-Ligandkomplexes und K_d als die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses
- 10 Komplexes wurden als freie Parameter an die normierten Daten angepaßt.

Das Ergebnis der Fluoreszenztitrationen des Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain ist in

15 Figur 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß Digitoxigenin noch stärker gebunden wird als Digoxigenin, während für Ouabain keine Bindung beobachtet wird.

Die aus den Fluoreszenztitrationen resultierenden Werte für die

20 Dissoziationskonstanten der Komplexe aus den Muteinen des Bilin-Bindungsproteins und den verschiedenen Liganden sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	<u>Bbp-Variante</u>	<u>Ligand</u>	<u>K_d [nM]</u>
25	Bbp:	Digoxigenin	-*
	DigA:	Digoxigenin	295 ± 37
		Digoxin	200 ± 34
	DigA16:	Digoxigenin	30,2 ± 3,6
		Digoxin	31,1 ± 3,2
30		Digitoxigenin	2,8 ± 2,7
		Digitoxin	2,7 ± 2,0
		Ouabain	-*
		Testosteron	-*
		4-Aminofluorescein	-*

35

*keine nachweisbare Bindungsaktivität

Beispiel 4: Herstellung von Fusionsproteinen aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase und Verwendung zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem ELISA sowie im Western Blot

5

Um zwei verschiedene Fusionsproteine aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit unterschiedlicher Anordnung der Partner innerhalb der Polypeptidkette zu produzieren, wurden unter Einsatz der dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden die beiden

10 Expressionsplasmide pBBP27 und pBBP29 konstruiert.

pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus PhoA einschließlich deren Signalsequenz, einem kurzen Peptid-Verbindungsstück mit der Aminosäuresequenz Pro-Pro-Ser-Ala, der dem maturen Mutein DigA16 entsprechenden Sequenz sowie dem Strep-tag II. Ein

15 relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP27 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:17 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der

20 XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus DigA16 mit vorangestellter OmpA-Signalsequenz, gefolgt von der

25 Peptidsequenz für das Strep-tag II, einer Sequenz von 5 Glycinresten und der maturen Sequenz der PhoA ohne die N-terminale Aminosäure Arginin. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP29 ist mit der kodierten

30 Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:18 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

35

Beide Plasmide kodieren zusätzlich für die bakterielle Protein-Disulfidisomerase DsbC auf einem separaten, in 3'-Richtung gelegenen Cistron. Die Plasmide sind in Figur 2 schematisch

dargestellt.

Die von den Plasmiden pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine wurden analog der in Beispiel 3 beschriebenen Methode zur Herstellung der einfachen Muteine produziert. Um nicht die Metallionen aus dem aktiven Zentrum der PhoA zu komplexieren, wurde der Aufschluß des bakteriellen Periplasmas mit EDTA-freiem Aufschlußpuffer durchgeführt. Als ein die äußere Zellmembran destabilisierendes Agens wurde dem Puffer Polymyxin-B-sulfat (2 mg/ml, Sigma) zugegeben. Alle weiteren zur Reinigung eingesetzten Puffer waren ebenfalls EDTA-frei.

Die mittels des Strep-tag II durch Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteine wurden über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Ausbeuten der Fusionsproteine lagen zwischen 100 und 200 µg je 2 l Kulturmedium. Die Reinheit der erhaltenen Fusionsproteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, entsprechend Beispiel 3, überprüft und zu 90-95 % bestimmt. Anschließend wurden die Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Konjugaten der Digoxigenin-Gruppe mit verschiedenen Proteinen sowohl in einem Sandwich-ELISA als auch im Western-Blot verwendet.

Während die verwendeten Konjugate von Digoxigenin mit RNaseA und BSA entsprechend Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin (Sigma) hergestellt, indem 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat gegeben wurden. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt.

Zum Nachweis von Digoxigenin-Gruppen in einem Sandwich-ELISA wurden die Vertiefungen von jeweils zwei Spalten einer Mikrotiterplatte (ELISA-Strips, 2x8 Well mit hoher Bindekapazität, F-Form, Greiner) mit je 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Digoxigenin-Konjugates bzw. des Ovalbumin-

Digoxigenin-Konjugates in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden die Vertiefungen einer fünften Spalte der Mikrotiterplatte mit 100 μ l einer 100 μ g/ml Lösung von nicht konjugiertem BSA (Sigma) in PBS befüllt und ebenfalls
5 über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 μ l einer Lösung von 2 % w/v BSA in PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 50 μ l einer 1 μ M Lösung des gereinigten Fusionsproteins gefüllt und
10 die Tween-Konzentration durch Zugabe von 1 μ l einer Lösung von 5 % v/v Tween auf 0,1 % v/v eingestellt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l PBST vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 μ l des gereinigten Fusionsproteins pipettiert, gemischt und davon
15 ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Spalte schrittweise 1:2 Verdünnungen zubereitet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Digoxigeningruppen gebundenen Fusionsproteine erfolgte schließlich mittels der
20 durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei
25 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.

Das Ergebnis dieser Messung ist in Figur 3 wiedergegeben. Dementsprechend wird die Digoxigeningruppe sowohl als Konjugat
30 mit BSA wie auch als Konjugat mit Ovalbumin erkannt, was darauf schließen läßt, daß die Bindung durch das Mutein DigA16 kontextunabhängig erfolgt. Weiterhin sind beide Fusionsproteine sowohl hinsichtlich der Bindungsfunktion für die Digoxigeningruppe als auch enzymatisch aktiv, und sie geben
35 trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus Anlaß zu nahezu identischen Signalen.

Zur Verwendung der von den Vektoren pBBP27 und pBBP29 kodierten

Fusionsproteine im Western-Blot wurden 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an Digoxigenin-BSA-Konjugat, Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat und Digoxigenin-RNaseA-Konjugat gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, sowie 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an nicht-derivatisiertem BSA, Ovalbumin und RNaseA ebenfalls gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteingemisch durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose übertragen (Blake et al., Anal. Biochem. 136 (1984), 175-179). Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in 10 ml PBST gewaschen und für 1 h mit 10 ml einer 0,5 μ M Lösung jeweils eines der beiden Fusionsproteine inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in 10 ml PBST und zweimal für 5 min in 10 ml PBS gewaschen und schließlich für 10 min in 10 ml AP-Puffer geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μ l BCIP (50 μ g/ml in Dimethylformamid) und 5 μ l NBT (75 μ g/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert und auf diese Weise gebundenes Fusionsprotein nachgewiesen.

Das Ergebnis dieses Nachweisverfahrens ist in Figur 4 wiedergegeben. Es zeigt sich wiederum, daß die Bindung der Digoxigenin-Gruppe durch beide Fusionsproteine unabhängig vom Trägerprotein ist, und daß mit beiden Fusionsproteinen vergleichbare Signalintensitäten erzielt werden. Dieselben Trägerproteine führen zu keinerlei Signal, wenn sie nicht mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert sind.

Patentansprüche

1. Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, dadurch gekennzeichnet, daß es

5 (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,

(b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und

10 (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
15 daß die Dissoziationskonstante des Komplexes mit Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine der
20 Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum
25 Bilin-Bindungsprotein trägt.

4. Polypeptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
daß es die in SEQ ID NO. 15 dargestellte Aminosäuresequenz
aufweist.

30

5. Polypeptid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Enzymmarkierung, radioaktiver Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-
35 Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold, trägt.

6. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder

mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne,
eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den
Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert
ist.

7. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder
mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein
Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine
Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den
Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert
ist.

8. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine
für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-
Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7
kodierende Sequenz umfaßt.

9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch
gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.
15 oder eine andere das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15
codierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10. Verfahren zur Gewinnung von Digoxigenin bindenden
Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, das die Schritte umfaßt:

(a) das Bilin-Bindungsprotein an mindestens einer der
Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90,
95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer Zufallsmutagenese zu
unterwerfen,

(b) resultierende Muteine mit Bindungsaffinität zur
Digoxigenin-Gruppe durch Selektion anzureichern und zu
isolieren,

(c) die in Schritt (b) erhaltenen Muteine an mindestens
einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 einer
erneuten Zufallsmutagenese zu unterwerfen, und

(d) die resultierenden Muteine wiederum durch Selektion
anzureichern und zu isolieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei in Schritt (b) die Selektion durch kompetitive Anreicherung durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei freies Digoxigenin oder Digitoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Anreicherung in Schritt (d) durch Komplexbildung der Muteine mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des Komplexes durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Dissoziation des Komplexes aus Mutein und Digoxigeningruppe in saurem oder basischem Milieu durchgeführt wird.

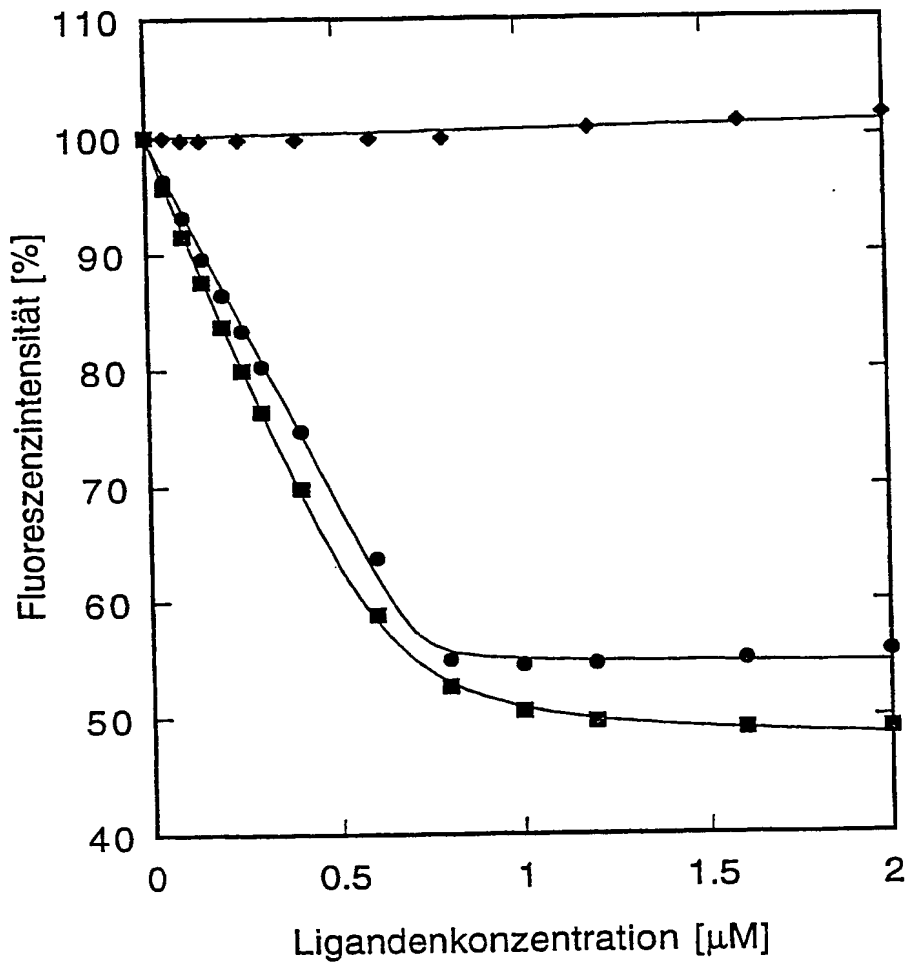
15. Verfahren zur Herstellung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder zur Herstellung eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird.

16. Verwendung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, zur Bindung, zum Nachweis, zur Bestimmung, Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

17. Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei

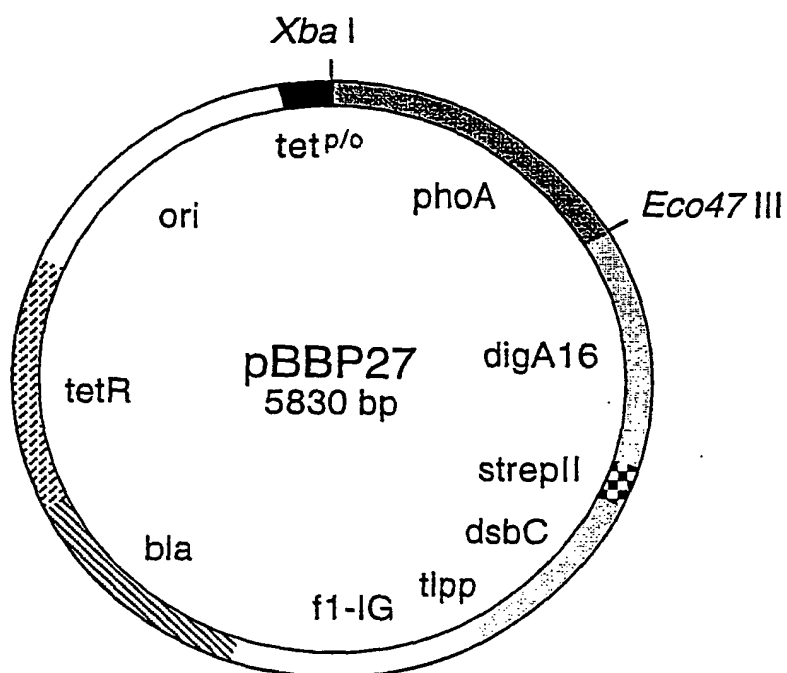
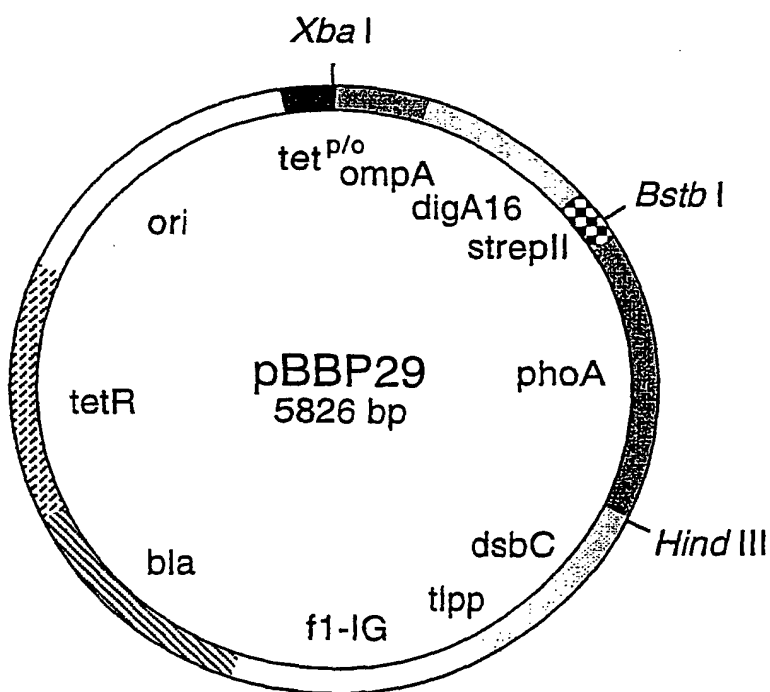
ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein
eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder
mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Mutein, das nach einem
Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14
erhältlich ist, mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des
Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des
Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt
gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins
bestimmt wird.

1/4

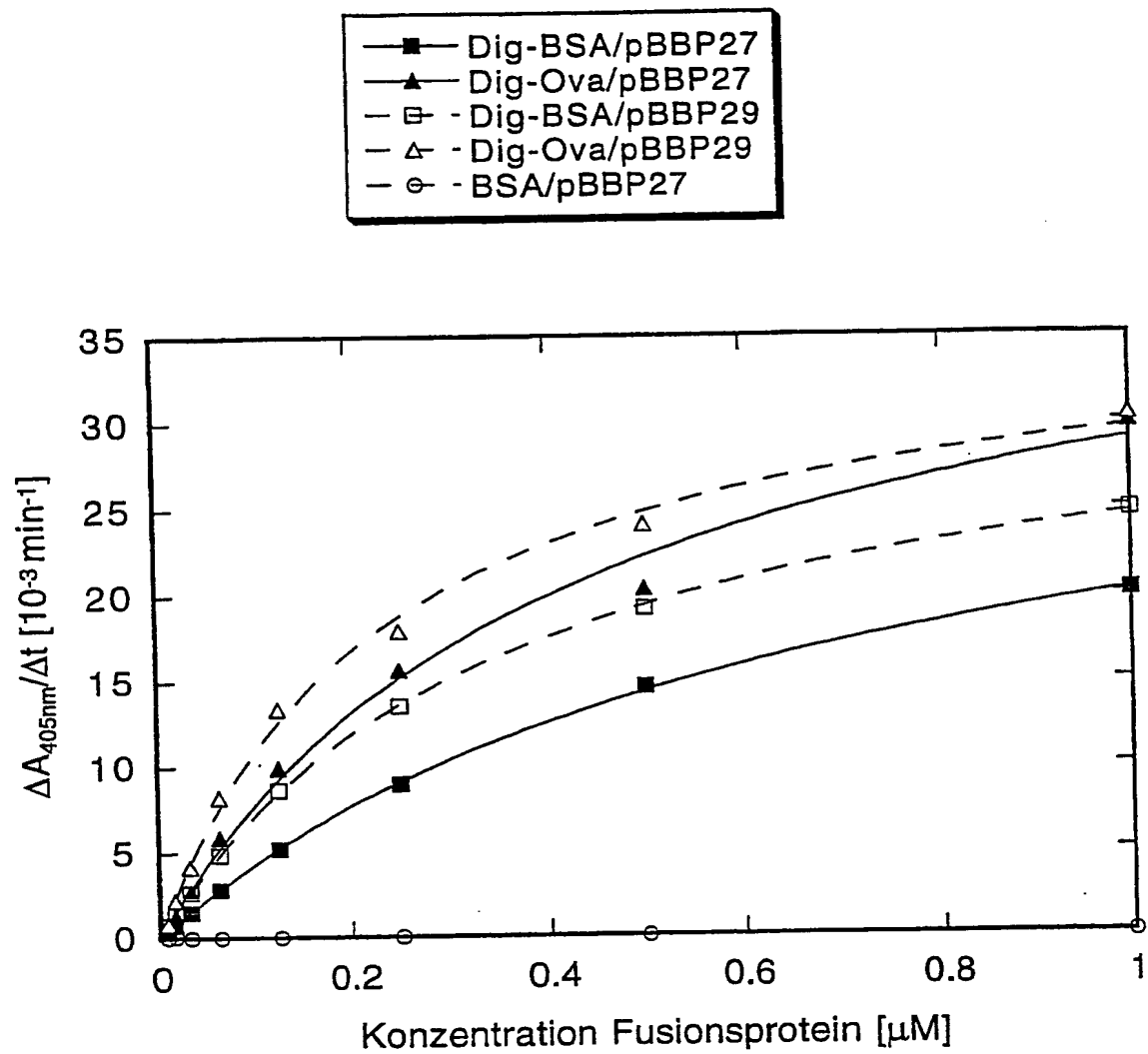


Figur 1

2/4

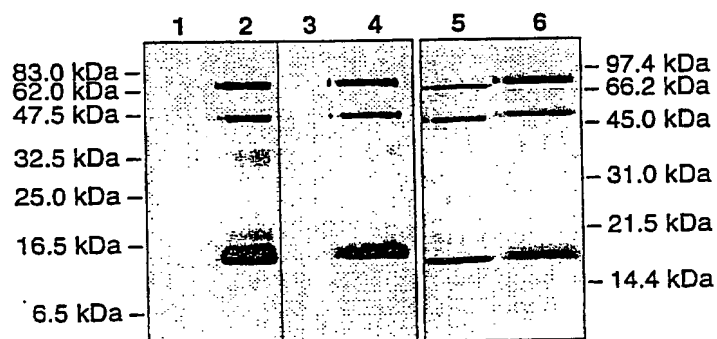
A**B****Figur 2**

3 / 4



Figur 3

4 / 4



Figur 4

Sequenzprotokoll

<110> Skerra, Arne, Prof. Dr.

5 <120> Muteine des Bilin-Bindungsproteins

<150> DE 199 26 068.0

<151> 1999-06-08

10 <160> 18

<210> 1

<211> 1219 Basenpaare

<212> DNA

15 <213> künstliche Sequenz

<220>

<221> sig_peptide

<222> (22)...(84)

20

<220>

<221> mat_peptide

<222> (85)...(1209)

25 <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-tag II und Fragment des
Phagen-Hüllproteins pIII

<220>

<221> CDS

<222> (85)...(606)

30 <223> matures Bilin-Bindungsprotein

<220>

<221> CDS

<222> (607)...(636)

35 <223> Strep-tag II-Affinitätsanhängsel

<220>

<221> CDS

<222> (637)...(639)

40 <223> Amber Stop-Codon

<220>

<221> CDS

<222> (640)...(1209)

45 <223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII

<400> 1

	TCTAGTTAAC GAGGGCAAAA A	ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT	45
		Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile	
5		-21 -20 -15	
	GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG	90	
	Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val		
		-10 -5 -1 1	
10	TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC	135	
	Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe		
		5 10 15	
15	GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC	180	
	Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr		
		20 25 30	
20	CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC	225	
	Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr		
		35 40 45	
	ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC	270	
	Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile		
25		50 55 60	
	CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT	315	
	His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly		
		65 70 75	
30	GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT	360	
	Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly		
		80 85 90	
35	GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG	405	
	Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys		
		95 100 105	
	AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG	450	
	Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys		
40		110 115 120	
	GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT	495	
	Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu		
45		125 130 135	
	ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC	540	
	Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser		
		140 145 150	
50	CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA	585	
	Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu		
		155 160 165	
55	GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC	630	
	Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe		
		170 175 180	
	GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC	675	
	Glu Lys Gln Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
60		185 190 195	
	TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC	720	
	Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly		
65		200 205 210	

	TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT	765
	Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe	
	215 220 225	
5	GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA	810
	Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu	
	230 235 240	
10	AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT	855
	Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu	
	245 250 255	
15	GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT	900
	Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile	
	260 265 270	
20	GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT	945
	Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp	
	275 280 285	
25	TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT	990
	Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp	
	290 295 300	
30	AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC	1035
	Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu	
	305 310 315	
35	CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA	1080
	Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys	
	320 325 330	
40	CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT	1125
	Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg	
	335 340 345	
45	GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA	1170
	Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val	
	350 355 360	
50	TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT	1209
	Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser	
	365 370 375	
55	TAATAAGCTT	1219

<210> 2

<211> 64 Basen

50 <212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

55

<400> 2

CCATGGTAAA TGGTGGGAAG TCGCCAAATA CCCCNNKNMS NNSNNKAAGT	50
ACGGAAAGTG CGGA	64

60

<210> 3

<211> 71 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

5

<220>

<223> Primer

<400> 3

10 GGGTAGGCGG TACCTTCSNN AAAGTATTCC TTGCCGTGGA TTACMNGTA 50
SNNCGAACT TTAGACTCT T 71

<210> 4

15

<211> 74 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

20

<223> Primer

<400> 4

25 CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNNSA CTNNKGGAGG TNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74

<210> 5

<211> 78 Basen

30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

35

<400> 5

TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCSNNGTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
ASNNGCAMNN GTATCCGATG ATGTAGTT 78

40

<210> 6

<211> 36 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

45

<220>

<223> Primer

<400> 6

50

CTTCGACTGG TCCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36

<210> 7
<211> 37 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

5

<220>
<223> Primer
<400> 7

10 CACCAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

<210> 8
<211> 46 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

15

<220>
<223> synthetischer Oligodesoxynukleotid

20

<400> 8

AGATCTTTCC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46

25

<210> 9
<211> 793 Basenpaare
<212> DNA
<213> Fragment des Plasmids pBBP22

30

<220>
<221> sig_peptide
<222> (22)...(84)

35

<220>
<221> mat_peptide
<222> (85)...(783)
<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Albumin-bindungsdomäne

40

<220>
<221> CDS
<222> (85)...(606)
<223> matures Bilin-Bindungsprotein

45

<220>

<221> CDS
 <222> (607)...(636)
 <223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (637)...(783)
 <223> Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G

10 <400> 9

```

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT      45
                        Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
                        -21 -20                               -15

15 GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG  90
   Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
                        -10                               -5          -1  1

20 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
   Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
                        5                               10          15

25 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
   Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
                        20                               25          30

30 CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
   Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
                        35                               40          45

35 ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
   Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
                        50                               55          60

40 CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
   His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
                        65                               70          75

45 GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
   Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
                        80                               85          90

50 GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
   Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
                        95                               100          105

55 AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
   Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
                        110                              115          120

60 GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
   Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
                        125                              130          135

65 ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
   Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
                        140                              145          150

70 CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
   Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
                        155                              160          165

```


GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180
 5 GAA AAA CCA GCT AGC CTG GCT GAA GCT AAA GTT CTG GCT AAC CGT 675
 Glu Lys Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
 185 190 195
 10 GAA CTG GAC AAA TAC GGT GTT TCC GAC TAC TAC AAA AAC CTC ATC 720
 Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
 200 205 210
 AAC AAC GCT AAA ACC GTT GAA GGT GTT AAA GCT CTG ATC GAC GAA 765
 Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu
 215 220 225
 15 ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT 793
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 230
 20

<210> 10

<211> 17 Basen

<212> DNA

25 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Sequenzierprimer

30 <400> 10

GACGGTGCCT GTCCCGA 17

<210> 11

35 <211> 17 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

40 <223> Sequenzierprimer

<400> 11

GACTACTGGG GAGCCGA 17

45

<210> 12

<211> 522 Basen

<212> DNA

<213> codierende Sequenz des Muteins DigA

50

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(522)

<223> Mutein DigA ohne Fusionsanteile

55

<400> 12

5	GAC Asp 1	GTG Val	TAC Tyr	CAC His	GAC Asp 5	GGT Gly	GCC Ala	TGT Cys	CCC Pro	GAA Glu 10	GTC Val	AAG Lys	CCA Pro	GTC Val	GAC Asp 15	45
10	AAC Asn	TTC Phe	GAC Asp	TGG Trp	TCC Ser 20	CAG Gln	TAC Tyr	CAT His	GGT Gly	AAA Lys 25	TGG Trp	TGG Trp	GAA Glu	GTC Val	GCC Ala 30	90
15	AAA Lys	TAC Tyr	CCC Pro	CAT His	CAC His 35	GAG Glu	CGG Arg	AAG Lys	TAC Tyr	GGA Gly 40	AAG Lys	TGC Cys	GGA Gly	TGG Trp	GCT Ala 45	135
20	GAG Glu	TAC Tyr	ACT Thr	CCT Pro	GAA Glu 50	GGC Gly	AAG Lys	AGT Ser	GTC Val	AAA Lys 55	GTT Val	TCG Ser	CGC Arg	TAC Tyr	TCT Ser 60	180
25	GTA Val	ATC Ile	CAC His	GGC Gly	AAG Lys 65	GAA Glu	TAC Tyr	TTT Phe	TCC Ser	GAA Glu 70	GGT Gly	ACC Thr	GCC Ala	TAC Tyr	CCA Pro 75	225
30	GTT Val	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	AAG Lys 80	ATT Ile	GGA Gly	AAG Lys	ATC Ile	TAC Tyr 85	CAC His	AGC Ser	TAC Tyr	ACT Thr	ATT Ile 90	270
35	GGA Gly	GGT Gly	GTG Val	ACC Thr	CAG Gln 95	GAG Glu	GGT Gly	GTA Val	TTC Phe	AAC Asn 100	GTA Val	CTC Leu	TCC Ser	ACT Thr	GAC Asp 105	315
40	AAC Asn	AAG Lys	AAC Asn	TAC Tyr	ATC Ile 110	ATC Ile	GGA Gly	TAC Tyr	TTT Phe	TGC Cys 115	TCG Ser	TAC Tyr	GAC Asp	GAG Glu	GAC Asp 120	360
45	AAG Lys	AAG Lys	GGA Gly	CAC His	ATG Met 125	GAC Asp	TTG Leu	GTC Val	TGG Trp	GTG Val 130	CTC Leu	TCC Ser	AGA Arg	AGC Ser	ATG Met 135	405
50	GTC Val	CTT Leu	ACT Thr	GGT Gly	GAA Glu 140	GCC Ala	AAG Lys	ACC Thr	GCT Ala	GTC Val 145	GAG Glu	AAC Asn	TAC Tyr	CTT Leu	ATC Ile 150	450
55	GGC Gly	TCC Ser	CCA Pro	GTA Val	GTC Val 155	GAC Asp	TCC Ser	CAG Gln	AAA Lys	CTG Leu 160	GTA Val	TAC Tyr	AGT Ser	GAC Asp	TTC Phe 165	495
60	TCT Ser	GAA Glu	GCC Ala	GCC Ala	TGC Cys 170	AAG Lys	GTC Val	AAC Asn	AAT Asn							522

<210> 13

<211> 76 Basen

<212> DNA

55 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

60 <400> 13

CTGGTCCCAG TACCATGGTA AATGGTGGNN KGTCGCCNNK TACCCCNKN 50
NKNKNKNAAG GTACGGAAAG TGCGGA 76

<210> 14
 <211> 1219 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> Fragment des Phasmids pBBP24
 5
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (22)...(84)
 10
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85)...(1209)
 <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Fragment des
 Phagen-Hüllproteins pIII, mit unterbrochenem Leserahmen
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (85)...(606)
 <223> matures Bilin-Bindungsprotein mit unterbrochenem Leserahmen
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (607)...(636)
 <223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel
 25
 <220>
 <221> CDS
 <222> (637)...(639)
 <223> Amber-Stoppcodon
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (640)...(1209)
 <223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII
 35
 <400> 14
 TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 -21 -20 -15
 40
 GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 -10 -5 -1 1
 45
 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15
 50
 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr

	275										280										285										
5	TTT	GCT	GGC	TCT	AAT	TCC	CAA	ATG	GCT	CAA	GTC	GGT	GAC	GGT	GAT	990															
	Phe	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	Gly	Asp																
			290					295					300																		
10	AAT	TCA	CCT	TTA	ATG	AAT	AAT	TTC	CGT	CAA	TAT	TTA	CCT	TCC	CTC	1035															
	Asn	Ser	Pro	Leu	Met	Asn	Asn	Phe	Arg	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu																
			305					310					315																		
15	CCT	CAA	TCG	GTT	GAA	TGT	CGC	CCT	TTT	GTC	TTT	GGC	GCT	GGT	AAA	1080															
	Pro	Gln	Ser	Val	Glu	Cys	Arg	Pro	Phe	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Lys																
			320					325					330																		
20	CCA	TAT	GAA	TTT	TCT	ATT	GAT	TGT	GAC	AAA	ATA	AAC	TTA	TTC	CGT	1125															
	Pro	Tyr	Glu	Phe	Ser	Ile	Asp	Cys	Asp	Lys	Ile	Asn	Leu	Phe	Arg																
			335					340					345																		
25	GGT	GTC	TTT	GCG	TTT	CTT	TTA	TAT	GTT	GCC	ACC	TTT	ATG	TAT	GTA	1170															
	Gly	Val	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr	Phe	Met	Tyr	Val																
			350					355					360																		
30	TTT	TCT	ACG	TTT	GCT	AAC	ATA	CTG	CGT	AAT	AAG	GAG	TCT			1209															
	Phe	Ser	Thr	Phe	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Ser																		
			365					370					375																		
	TAATAAGCTT															1219															
35	<210> 15																														
	<211> 522 Basenpaare																														
	<212> DNA																														
	<213> codierende Sequenz des Muteins DigA16																														
40	<220>																														
	<221> CDS																														
	<222> (1)...(522)																														
	<223> Mutein DigA16 ohne Fusionsanteile																														
45	<400> 15																														
50	GAC	GTG	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	45															
	Asp	Val	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp																
	1				5					10					15																
55	AAC	TTC	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	CAG	GTC	GCC	90															
	Asn	Phe	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Ala																
					20					25					30																
60	GCG	TAC	CCC	GAT	CAT	ATT	ACG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	135															
	Ala	Tyr	Pro	Asp	His	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala																
					35					40					45																
65	GAG	TAC	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	TAC	TCT	180															
	Glu	Tyr	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser																
					50					55					60																
70	GTA	ATC	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	TAC	CCA	225															
	Val	Ile	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro																
					65					70					75																


```

      GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
      Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
                        80                        85                        90

5     GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
      Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
                        95                        100                       105

10    AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
      Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
                        110                       115                       120

15    AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
      Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met
                        125                       130                       135

20    GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
      Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile
                        140                       145                       150

20    GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
      Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
                        155                       160                       165

25    TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT                               522
      Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
                        170

30    <210> 16
      <211> 1380 Basenpaare
      <212> DNA
      <213> Fragment des Plasmids PBBP21

35    <220>
      <221> sig_peptide
      <222> (22)...(84)

      <220>
40    <221> mat_peptide
      <222> (85)...(636)
      <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und Strep-Tag II

      <220>
45    <221> sig_peptide
      <222> (658)...(717)

      <220>
      <221> mat_peptide
50    <222> (718)...(1365)
      <223> DsbC-Protein

      <400> 16

55    TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT       45
      Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile

```


							-21	-20						-15					
5	GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90			
	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val				
			-10						-5				-1	1					
10	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135			
	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe				
			5					10					15						
15	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	AAA	TAC	180			
	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr				
			20					25					30						
20	CCC	AAC	TCA	GTT	GAG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225			
	Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr				
			35					40					45						
25	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	AAC	TAC	CAC	GTA	ATC	270			
	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	His	Val	Ile				
			50					55					60						
30	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	ATT	GAA	GGA	ACT	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315			
	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly				
			65					70					75						
35	GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	CTG	ACT	TAC	GGA	GGT	360			
	Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly				
			80					85					90						
40	GTC	ACC	AAG	GAG	AAC	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405			
	Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys				
			95					100					105						
45	AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TAC	TGC	AAA	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450			
	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys				
			110					115					120						
50	GGA	CAC	CAA	GAC	TTC	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495			
	Gly	His	Gln	Asp	Phe	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu				
			125					130					135						
55	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540			
	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser				
			140					145					150						
60	CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585			
	Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu				

	20	25	30	
5	ACT AAC AGC GGC GTG TTG TAC ATC ACC GAT GAT GGT AAA CAT ATC 855 Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys His Ile 35 40 45			
10	ATT CAG GGG CCA ATG TAT GAC GTT AGT GGC ACG GCT CCG GTC AAT 900 Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val Asn 50 55 60			
15	GTC ACC AAT AAG ATG CTG TTA AAG CAG TTG AAT GCG CTT GAA AAA 945 Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys 65 70 75			
20	GAG ATG ATC GTT TAT AAA GCG CCG CAG GAA AAA CAC GTC ATC ACC 990 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr 80 85 90			
25	GTG TTT ACT GAT ATT ACC TGT GGT TAC TGC CAC AAA CTG CAT GAG 1035 Val Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu 95 100 105			
30	CAA ATG GCA GAC TAC AAC GCG CTG GGG ATC ACC GTG CGT TAT CTT 1080 Gln Met Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu 110 115 120			
35	GCT TTC CCG CGC CAG GGG CTG GAC AGC GAT GCA GAG AAA GAA ATG 1125 Ala Phe Pro Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met 125 130 135			
40	AAA GCT ATC TGG TGT GCG AAA GAT AAA AAC AAA GCG TTT GAT GAT 1170 Lys Ala Ile Trp Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp 140 145 150			
45	GTG ATG GCA GGT AAA AGC GTC GCA CCA GCC AGT TGC GAC GTG GAT 1215 Val Met Ala Gly Lys Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp 155 160 165			
50	ATT GCC GAC CAT TAC GCA CTT GGC GTC CAG CTT GGC GTT AGC GGT 1260 Ile Ala Asp His Tyr Ala Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly 170 175 180			
55	ACT CCG GCA GTT GTG CTG AGC AAT GGC ACA CTT GTT CCG GGT TAC 1305 Thr Pro Ala Val Val Leu Ser Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr 185 190 195			
60	CAG CCG CCG AAA GAG ATG AAA GAA TTC CTC GAC GAA CAC CAA AAA 1350 Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu Phe Leu Asp Glu His Gln Lys 200 205 210			
	ATG ACC AGC GGT AAA TAATTCGCGT AGCTT 1380 Met Thr Ser Gly Lys 215			
	<210> 17			
	<211> 2009 Basenpaare			
	<212> DNA			
	<213> Fragment des Plasmids PBBP27			
	<220>			
	<221> sig_peptide			
	<222> (23)...(85)			

<220>

<221> mat_peptide

<222> (86)...(1999)

<223> Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase, Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala, Mutein DigA16 und Strep-Tag II

<220>

<221> CDS

<222> (86)...(1435)

10 <223> maturer Teil der Alkalischen Phosphatase

<220>

<221> CDS

<222> (1436)...(1447)

15 <223> Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala

<220>

<221> CDS

<222> (1448)...(1969)

20 <223> Mutein DigA16

<220>

<221> CDS

<222> (1970)...(1999)

25 <223> Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel

<400> 17

30	TCTAGAACAT GGAGAAAATA AA GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG	46
	Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu	
	-21 -20 -15	
35	GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA	91
	Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr	
	-10 -5 -1 1	
40	CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT	136
	Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile	
	5 10 15	
45	ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC	181
	Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala	
	20 25 30	
50	GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT	226
	Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile	
	35 40 45	
55	TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA	271
	Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala	
	50 55 60	
60	CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT	316
	Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp	
	65 70 75	

	GCC	TTA	CCG	CTT	ACC	GGG	CAA	TAC	ACT	CAC	TAT	GCG	CTG	AAT	AAA	361
	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	
			80					85					90			
5	AAA	ACC	GGC	AAA	CCG	GAC	TAC	GTC	ACC	GAC	TCG	GCT	GCA	TCA	GCA	406
	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	
			95					100					105			
10	ACC	GCC	TGG	TCA	ACC	GGT	GTC	AAA	ACC	TAT	AAC	GGC	GCG	CTG	GGC	451
	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr	Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	
			110					115					120			
15	GTC	GAT	ATT	CAC	GAA	AAA	GAT	CAC	CCA	ACG	ATT	CTG	GAA	ATG	GCA	496
	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	Met	Ala	
			125					130					135			
20	AAA	GCC	GCA	GGT	CTG	GCG	ACC	GGT	AAC	GTT	TCT	ACC	GCA	GAG	TTG	541
	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	
			140					145					150			
25	CAG	GAT	GCC	ACG	CCC	GCT	GCG	CTG	GTG	GCA	CAT	GTG	ACC	TCG	CGC	586
	Gln	Asp	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val	Thr	Ser	Arg	
			155					160					165			
30	AAA	TGC	TAC	GGT	CCG	AGC	GCG	ACC	AGT	GAA	AAA	TGT	CCG	GGT	AAC	631
	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn	
			170					175					180			
35	GCT	CTG	GAA	AAA	GGC	GGA	AAA	GGA	TCG	ATT	ACC	GAA	CAG	CTG	CTT	676
	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	
			185					190					195			
40	AAC	GCT	CGT	GCC	GAC	GTT	ACG	CTT	GGC	GGC	GGC	GCA	AAA	ACC	TTT	721
	Asn	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe	
			200					205					210			
45	GCT	GAA	ACG	GCA	ACC	GCT	GGT	GAA	TGG	CAG	GGA	AAA	ACG	CTG	CGT	766
	Ala	Glu	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	
			215					220					225			
50	GAA	CAG	GCA	CAG	GCG	CGT	GGT	TAT	CAG	TTG	GTG	AGC	GAT	GCT	GCC	811
	Glu	Gln	Ala	Gln	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	
			230					235					240			
55	TCA	CTG	AAT	TCG	GTG	ACG	GAA	GCG	AAT	CAG	CAA	AAA	CCC	CTG	CTT	856
	Ser	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	
			245					250					255			
60	GGC	CTG	TTT	GCT	GAC	GGC	AAT	ATG	CCA	GTG	CGC	TGG	CTA	GGA	CCG	901
	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Gly	Asn	Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	
			260					265					270			
65	AAA	GCA	ACG	TAC	CAT	GGC	AAT	ATC	GAT	AAG	CCC	GCA	GTC	ACC	TGT	946
	Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	Asn	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	
			275					280					285			
70	ACG	CCA	AAT	CCG	CAA	CGT	AAT	GAC	AGT	GTA	CCA	ACC	CTG	GCG	CAG	991
	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	Asp	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	
			290					295					300			
75	ATG	ACC	GAC	AAA	GCC	ATT	GAA	TTG	TTG	AGT	AAA	AAT	GAG	AAA	GGC	1036
	Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	
			305					310					315			
80	TTT	TTC	CTG	CAA	GTT	GAA	GGT	GCG	TCA	ATC	GAT	AAA	CAG	GAT	CAT	1081
	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	Ile	Asp	Lys	Gln	Asp	His	
			320					325					330			

	GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT 1126
	Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp
	335 340 345
5	GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC 1171
	Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn
	350 355 360
10	ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT 1216
	Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile
	365 370 375
15	GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT 1261
	Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn
	380 385 390
20	ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA 1306
	Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu
	395 400 405
25	GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG 1351
	Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala
	410 415 420
30	TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC 1396
	Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr
	425 430 435
35	GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA CCG CCT 1441
	Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Pro Pro
	440 445 450
40	AGC GCT GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA 1486
	Ser Ala Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro
	455 460 465
45	GTC GAC AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG 1531
	Val Asp Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln
	470 475 480
50	GTC GCC GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA 1576
	Val Ala Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly
	485 490 495
55	TGG GCT GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC 1621
	Trp Ala Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg
	500 505 510
60	TAC TCT GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC 1666
	Tyr Ser Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala
	515 520 525
65	TAC CCA GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC 1711
	Tyr Pro Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr
	530 535 540
70	ACT ATT GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC 1756
	Thr Ile Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser
	545 550 555
75	ACT GAC AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC 1801
	Thr Asp Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp
	560 565 570
80	GAG GAC AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA 1846
	Glu Asp Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg
	575 580 585

AGC ATG GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC 1891
 Ser Met Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr
 590 595 600

5 CTT ATC GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT 1936
 Leu Ile Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser
 605 610 615

10 GAC TTC TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT 1981
 Asp Phe Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser
 620 625 630

15 CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAATAAGCTT 2009
 His Pro Gln Phe Glu Lys
 635

<210> 18
 <211> 2005 Basenpaare
 20 <212> DNA
 <213> Fragment des Plasmids PBBP29

<220>
 <221> sig_peptid
 25 <222> (22)...(84)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85)...(1998)
 30 <223> Fusionsprotein aus Mutein DigA16, Strep-Tag II, Verbindungspeptid
 Gly(5) und Alkalischer Phosphatase

<220>
 <221> CDS
 35 <222> (85)...(606)
 <223> Mutein DigA16

<220>
 <221> CDS
 40 <222> (607)...(636)
 <223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

<220>
 <221> CDS
 45 <222> (637)...(651)
 <223> Verbindungspeptid Gly-Gly-Gly-Gly-Gly

<220>
 <221> CDS
 50 <222> (652)...(1998)
 <223> Alkalische Phosphatase ohne Signalsequenz und N-terminales Arg

<400> 18

	TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT		45			
				Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile					
				-21	-20					-15						
5	GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90
	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	
				-10					-5				-1	1		
10	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135
	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe	
			5					10					15			
15	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	CAG	GTC	GCC	GCG	TAC	180
	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Ala	Ala	Tyr	
			20					25					30			
20	CCC	GAT	CAT	ATT	ACG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225
	Pro	Asp	His	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr	
			35					40					45			
25	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	TAC	TCT	GTA	ATC	270
	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile	
			50					55					60			
30	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
			65					70					75			
35	GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	TAC	ACT	ATT	GGA	GGT	360
	Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gly	Gly	
			80					85					90			
40	GTG	ACC	CAG	GAG	GGT	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
	Val	Thr	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
			95					100					105			
45	AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TTT	TGC	TCG	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
			110					115					120			
50	GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
	Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
			125					130					135			
55	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
			140					145					150			
60	CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
	Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
			155					160					165			
65	GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
	Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
			170					175					180			
70	GAA	AAA	GGT	GGC	GGC	GGT	GGT	ACA	CCA	GAA	ATG	CCT	GTT	CTG	GAA	675
	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	Met	Pro	Val	Leu	Glu	
			185					190					195			
75	AAC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	ACT	GCA	CCC	GGC	GGT	GCT	CGC	720
	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	
			200					205					210			
80	CGT	TTA	ACG	GGT	GAT	CAG	ACT	GCC	GCT	CTG	CGT	GAT	TCT	CTT	AGC	765
	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	

	215	220	225	
5	GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG 810 Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met 230 235 240			
10	GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG 855 Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala 245 250 255			
15	GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA 900 Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln 260 265 270			
20	TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC 945 Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr 275 280 285			
25	GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC 990 Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val 290 295 300			
30	AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT 1035 Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp 305 310 315			
35	CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC 1080 His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr 320 325 330			
40	GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG 1125 Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala 335 340 345			
45	CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG 1170 Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala 350 355 360			
50	ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA 1215 Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys 365 370 375			
55	GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG 1260 Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr 380 385 390			
60	CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT 1305 Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly 395 400 405			
65	GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT 1350 Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly 410 415 420			
	TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA 1395 Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu 425 430 435			
	GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT 1440 Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn 440 445 450			
	ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT 1485 Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn 455 460 465			
	ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT 1530 Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn			

	470	475	480	
5	GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA 1575 Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu 485 490 495			
10	TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT 1620 Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly 500 505 510			
15	GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA 1665 Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln 515 520 525			
20	ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG 1710 Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu 530 535 540			
25	GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT 1755 Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala 545 550 555			
30	GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT 1800 Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala 560 565 570			
35	CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG 1845 Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met 575 580 585			
40	GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC 1890 Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr 590 595 600			
45	GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT 1935 Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn 605 610 615			
	GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA 1980 Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys 620 625 630			
	GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAAGCTT 2005 Ala Ala Leu Gly Leu Lys 635			

